



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNologiÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**BIOTECHNOLOGICKÁ PRODUKCE VYBRANÝCH
BIOPOLYMERŮ S VYUŽITÍM HALOFERAX MEDITERRANEI**

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF SELECTED BIOPOLYMERS EMPLOYING HALOFERAX
MEDITERRANEI

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Paulína Strečanská

VEDOUcí PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1117/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Paulína Strečanská**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Biotechnologická produkce vybraných biopolymerů s využitím *Haloferax mediterranei*

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše
2. Experimentální studium mikrobiální produkce PHA
3. Experimentální studium mikrobiální produkce extracelulárních polymerů

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Paulína Strečanská
student(ka)

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Cieľom práce je štúdium produkcie vybraných biopolymérov, polyhydroxyalkanoátov (PHA) a extracelulárnych polysacharidov (EPS) pomocou *Haloferax mediterranei*. V prvej časti sa nachádza teoretický podklad zahŕňajúci vlastnosti biopolymérov, výhody a ciele ich komerčnej produkcie, charakteristiku a pozitívne aspekty kultivácie extrémne halofilného archeónu *Haloferax mediterranei*. Experimentálna časť bola zameraná na štúdium vplyvu koncentrácie odpadných substrátov, ako je proteolytický hydrolyzát srvátky a hydrolyzát peria na produkciu PHA a EPS. Dalším študovaným vplyvom bol objem média a s ním súvisiaci prístup kyslíku. PHA, konkrétne kopolymér P(3HB-*co*/3HV) bol analyzovaný plynovou chromatografiou s FID detekciou. Pri použití média s obsahom 25 % proteolytického hydrolyzáta srvátky bez prídavku glukózy bol dosiahnutý obsah 3HV v PHA až 15,09 %. Ako vhodné sa osvedčili aj médiá s obsahom 10 % hydrolyzáta peria a 10% hydrolyzáta s prídavkom 30 g/l glukózy v objeme média 50 ml v 250 ml Erlenmeyerovej banke. *Haloferax mediterranei* bol schopný produkcie biomasy a akumulácie PHA s využitím odpadného substrátu proteínového charakteru aj bez prídavku substrátu sacharidovej povahy.

Kľúčové slová

Haloferax mediterranei, biopolyméry, polyhydroxyalkanoáty, extracelulárne polysacharidy, P(3HB-*co*-3HV), hydrolyzát srvátky, hydrolyzát peria

Abstract

Aim of this bachelor thesis is to study of production of selected biopolymers, polyhydroxyalkanoates (PHA) and extracellular polysaccharides (EPS) by *Haloferax mediterranei*. The first part contains theoretical background including properties of biopolymers, advantages and purposes of commercial production, characteristics and positive aspects of cultivation of extreme halophile archaea *Haloferax mediterranei*. The experimental part is focused on study of effects of concentration of waste substrates, such as proteolytic whey hydrolysate and feather hydrolysate on PHA and EPS production. The effect of medium volume and its correlation with access of oxygen on biopolymer production were studied as well. PHA, in particular copolymer P(3HB-*co*/3HV) was analysed by gas chromatography with FID detection. The content of 3HV in PHA to 15,09 % was achieved using medium which contains 25 % proteolytic whey hydrolysate without glucose supplementation. Medium with 10 % of feather hydrolysate and 10 % of feather hydrolysate with 30 g/l glucose proved to be suitable in volume 50 ml in 250 ml Erlenmeyer flask. *Haloferax mediterranei* was able to produce biomass and accumulate PHA using protein substrate without need of saccharide supplementation.

Keywords

Haloferax mediterranei, biopolymers, polyhydroxyalkanoates, extracellular polysaccharides, P(3HB-*co*-3HV), whey hydrolysate, feather hydrolysate

Bibliografická citácia

STREČANSKÁ, P. Biotechnologická produkce vybraných biopolymerů s využitím *Haloferax mediterranei*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 61 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

Prehlásenie

Prehlasujem, že som bakalársku prácu ne tému biotechnologická produkcia vybraných biopolymérov s využitím *Haloferax mediterranei* vypracovala samostatne pod vedením svojho vedúceho doc. Ing. Stanislava Obruču, Ph.D. a s použitím literatúry uvedenej v zozname použitých zdrojov.

V Brne dňa 19. 5. 2017

.....

Paulína Strečanská

PodĎakovanie

Na tomto mieste by som sa rada poďakovala svojmu vedúcemu bakalárskej práce doc. Ing. Stanislavovi Obručovi Ph.D. za odborné vedenie a podporu. Ďalej Ing. Pavle Benešovej za pomoc v laboratóriu a v rozvoji vlastných myšlienok, za možnosť konzultácii a vždy pohotové odpovede na všetky moje otázky. Rovnako patrí vďaka môjmu konzultantovi Ing. Danovi Kučerovi.

Chcela by som sa poďakovať svojim rodičom a blízkym, ktorí ma vždy s láskou a pochopením podporovali. Svojim spolužiakom a priateľom za zdieľanie ťažkostí, radostí a úsmevných situácií z laboratórneho prostredia.

Nakoniec patrí vďaka môjmu priateľovi Marekovi Hrvolovi, ktorý mi sprevádzkoval Latex a trpezlivo rozhrňal chmúry na tvári na ceste za Biotechnologickou produkciou vybraných biopolymérov pomocou *Haloferax mediterranei*.

Paulína Strečanská

OBSAH

1	Úvod	7
2	Teoretická časť	8
2.1	Biopolyméry	8
2.1.1	Charakteristika	8
2.1.2	Komerčná produkcia	8
2.2	Polyhydroxyalkanoáty	9
2.2.1	Charakteristika	9
2.2.2	Biosyntéza	10
2.2.3	Biodegradabilita	11
2.2.4	Mikrobiálna produkcia	12
2.2.5	Optimalizácia produkcie	13
2.3	Halofilné organizmy	14
2.3.1	PHA produkcia pomocou <i>Haloferax mediterranei</i>	16
2.4	Exopolysacharidy	17
2.4.1	Charakteristika	17
2.4.2	Aplikácia	18
2.4.3	Syntéza EPS pomocou <i>Haloferax mediterranei</i>	18
3	Praktická časť	20
3.1	Materiály a metódy	20
3.1.1	Použité chemikálie	20
3.1.2	Použité prístroje	21
3.2	Kultivácia <i>Haloferax mediterranei</i>	21
3.2.1	Živné médium	21
3.2.2	Príprava inokula	23
3.3	Štúdium vplyvu substrátu na produkciu biopolymérov kultúrou <i>Haloferax mediterranei</i>	23
3.3.1	Štúdium vplyvu koncentrácie hydrolyzátu srvátky na produkciu biopolymérov	23
3.3.2	Štúdium vplyvu koncentrácie hydrolyzátu peria na produkciu biopolymérov	23
3.3.3	Štúdium vplyvu objemu média na produkciu biopolymérov	24
3.4	Analýza	24
3.4.1	Spektrofotometrické stanovenie biomasy	24
3.4.2	Gravimetrické stanovenie biomasy	24
3.4.3	Stanovenie redukujúcich sacharidov pomocou 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny	24
3.4.4	Stanovenie celulárnych proteínov Hartree-Lowryho metódou	25
3.4.5	Stanovenie PHA pomocou GC-FID	26
3.4.6	Stanovenie EPS gravimetricky	27
4	Výsledky a diskusia	28
4.1	Kalibrácia metód	28
4.1.1	Stanovenie koncentrácie redukujúcich sacharidov	28
4.1.2	Stanovenie koncentrácie celulárnych proteínov	28
4.1.3	Stanovenie koncentrácie PHA	29
4.2	Štúdium vplyvu koncentrácie hydrolyzátu srvátky na produkciu biopolymérov	31

4.2.1	Stanovenie koncentrácie biomasy	31
4.2.2	Stanovenie koncentrácie PHA	33
4.2.3	Stanovenie koncentrácie EPS	34
4.3	Štúdium vplyvu koncentrácie hydrolyzátu peria na produkciu biopolymérov . . .	36
4.3.1	Stanovenie koncentrácie biomasy	36
4.3.2	Stanovenie koncentrácie PHA a celulárnych proteínov	37
4.3.3	Stanovenie koncentrácie EPS	40
4.4	Štúdium vplyvu objemu živného média na produkciu PHA a EPS	41
4.4.1	Stanovenie biomasy	42
4.4.2	Stanovenie koncentrácie PHA a celulárnych proteínov	43
4.4.3	Stanovenie koncentrácie EPS	46
5	Záver	48
	Literatúra	50
	Zoznam použitých skratiek	54
	Zoznam obrázkov	55
	Zoznam tabuliek	58
	Zoznam príloh	59
	A Charakteristika hydrolyzátu srvátky	60
	B Charakteristika hydrolyzátu peria	61

1 ÚVOD

Prírodné polyméry vždy predstavovali jednu z esenciálnych zložiek života ako potrava, úkryt, odev a zdroj energie. Biosyntéza makromolekúl enzýmatickými, bakteriálnymi a chemickými polymerizáciami špecifických molekulových štruktúr predstavuje kľúčový krok v rámci evolúcie živých organizmov. Veľkej popularite sa tešia plasty vyrábané petrochemickým priemyslom, najmä vďaka značnému množstvu možných aplikácií. Aj napriek tomu, že je s nimi človek bežne konfrontovaný v každodennom živote, je si vedomý ich nepriaznivých vplyvov a negatívneho dopadu na životné prostredie. Pri ich výrobe sú spracovávané suroviny z neobnoviteľných zdrojov a odpad, ktorý sa množí len zriedka prejde procesom recyklácie a nájde druhú šancu na využitie. Uvedomením si týchto rizík širokou verejnosťou sa začal zvyšovať dopyt po možných alternatívach, ktoré by predstavovali menšie riziko, zároveň však spĺňali pozitívne vlastnosti plastov a najmä cenu realizácie veľkovýroby.

Dnes už je zrejmé, že živé organizmy sú schopné vyprodukovať množstvo biopolymérov. V posledných rokoch bol výskum zameraný najmä na pochopenie základných biosyntéz a dôležitých prekursorov polymerizačných reakcií. Táto snaha porozumieť molekulárnym procesom a rozvoj optimalizovanej mikrobiálnej produkcie sú objektom záujmu biotechnológie. Vo svojej bakalárskej práci sa budem zaoberať produkciou biopolymérov, konkrétne polyhydroxyalkanoátov a extracelulárnych polysacharidov, ktoré produkuje halofilný archeón *Haloferax mediterranei*.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Biopolyméry

2.1.1 Charakteristika

Pojem biopolymér je používaný v množstve významov, v závislosti na poli pôsobenia. Vo všeobecnosti akceptovaná definícia zahŕňa polyméry, ktoré prislúchajú do kategórie vyrobených z obnoviteľných zdrojov alebo biodegradabilné, prípadne patriace do oboch [1]. Biopolyméry a ich deriváty sú rozmanité a pre život potrebné látky. Ich značná časť predstavuje neoddeliteľnú súčasť rastlinných a živočíšnych tiel [2]. Je možné konštatovať, že biopolyméry boli vyprodukované organizmami vykazujúcimi život. Preukazujú špecifické vlastnosti, čo je dôvodom pre ich stále rastúcu využiteľnosť. Materiálové vlastnosti biopolymérov, ktoré môžu mať podobu od viskózných roztokov až po plasty, závisia od zloženia a molekulovej hmotnosti polyméru [2].

Je možné ich klasifikovať podľa výskytu v rámci systému živých organizmov na rastlinné, živočíšne a bakteriálne. Súčasťou rastlinnej produkcie sú dôležitými zástupcami celulóza, lignín, hemicelulóza, kaučuk, drevné živice, terpény, škrob a rastlinné oleje. Medzi živočíšne patrí chitín a chitosan [3]. Mnohé biopolyméry, polysacharidy, polyestery a polyamidy, sú prirodzene produkované mikroorganizmami. Možnosť manipulácie s mikroorganizmami otvára nesmierny potenciál biotechnologickej produkcií polymérov, ktorých vlastnosti sú modifikovateľné. Produkty ako sú bioplasty svojou biodegradovateľnosťou ponúkajú ekologicky prijateľnejšiu alternatívu petrochemických plastov [2].

2.1.2 Komerčná produkcia

So stále zvyšujúcim sa zreteľom na ochranu životného prostredia sa dostáva biodegradabilným polymérom a biozlúčeninám značná pozornosť ako šetrnejším nástupcom syntetických plastov s veľkým množstvom aplikácií [4]. Tradičné plasty sú vyrobené z ropy, ktorá je považovaná za neobnoviteľný zdroj. Hoci použité plasty môžu byť recyklované, množstvo objemného odpadu je akumulované v prírode a jeho rezistencia voči prírodnej degradácii vedie k vážnym hrozbám pre životné prostredie. Vytvára sa tak problém vysporiadania sa s nerozložiteľným odpadom, ktorému čelí dnešná moderná spoločnosť. Tieto skutočnosti majú za následok zameranie výskumu na produkciu biodegradabilných polymérov za účelom zmierniť problémy znečistenia [4].

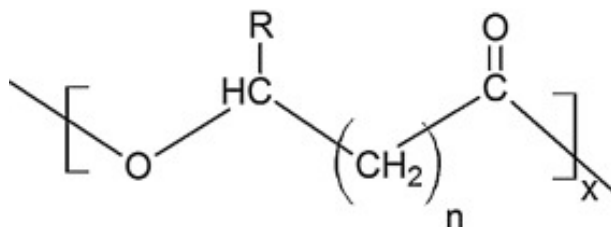
Hlavný rozdiel medzi polymérmi na ropnej báze a biodegradabilnými polymérmi je rozložiteľnosť vzniknutého odpadu pôdnymi mikroorganizmami. Biopolyméry obsahujú uhlík a dusík, prvky, ktoré umožňujú rast mikroorganizmov. Tie sú schopné enzymaticky štiepiť látky až na oxid uhličitý a vodnú paru [5].

Dnes sú známe rozličné druhy biodegradabilných polymérov, spomedzi ktorých vyčnievajú polyestery, vďaka ich esterovým väzbám, ktoré je možno hydrolyzovať. Hrajú dôležitú rolu ako biodegradabilné plasty. Polyestery, o ktoré je komerčný záujem sú polyhydroxyalkanoáty (PHA) ako sú polyhydroxyhexanoát, polyhydroxybutyrát, polyhydroxyvalerát, polymliečna kyselina, polykaprolakton, polybutylén sukcinát a iné [5].

2.2 Polyhydroxyalkanoáty

2.2.1 Charakteristika

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) sú z chemického hľadiska organické polyestery zložené z (R)-3-hydroxymastných kyselín (obr. 2.1). Štruktúrne sú polyhydroxyalkanoáty klasifikované na základe počtu uhlíkových atómov tvoriacich monoméne jednotky od 4 do 14. Môžu tvoriť homopolyméry alebo heteropolyméry. PHA obsahujúce monomér z 3 až 5 atómov uhlíka sú považované za PHA s krátkym reťazcom (scl PHA). Do tejto skupiny sa radia poly(3-hydroxybutyrát) a poly(4-hydroxybutyrát). Ďalšiu skupinu tvoria polyhydroxyalkanoáty so strednou dĺžkou reťazca (mcl PHA), ktoré obsahujú monoméry z 6 až 14 atómov uhlíka. Príkladmi sú homopolyméry poly(3-hydroxyhexanoát), poly(3-hydroxyoktanoát) a heteropolyméry ako poly(3-hydroxyhexanoát-co-3-hydroxyoktanoát) [6].



Obr. 2.1: Chemická štruktúra polyhydroxyalkanoátov [7]

PHA sú syntetizované mnohými grampozitívnymi a gramnegatívnymi baktériami najmenej 75 rôznych druhov [2]. Slúžia ako uhlíková a energetická zásoba mikroorganizmu. Za špecifických stresových podmienok tvoria až 90 % bunečnej hmoty. Za tieto podmienky je možno považovať nedostatok živín ako je kyslík, dusík, fosfor, síra, železo alebo horčík [8]. PHA granule sa nachádzajú v cytoplazme vo forme diskretných inklúzií guľatého tvaru s veľkosťou priemeru asi 0,2 až 0,5 mm [9]. Obsahujú polyesterové jadro obklopené fosfolipidovou vrstvou obsahujúcou proteíny [2]. Použitie farbiva Sudan Black B umožňuje jasne vidieť, že inklúzie obsahujú vrstvu lipidovej povahy. Pri použití oxazínového farbiva Nile Blue A pri excitačnej vlnovej dĺžke 460 nm PHA vykazujú výraznú oranžovú fluorescenciu [9]. PHA sú vo vode nerozpustné, čo je dôvodom, prečo sa polyméry zhromažďujú ako intracelulárne granule. Tento spôsob zhromažďovania živín je pre baktérie výhodný. Polymerizáciou vo vode rozpustných intermediátov na nerozpustné molekuly bunka nepodlieha premenám jej osmotického stavu. Vďaka tomu nedochádza k unikaniu týchto hodnotných zlúčenín a zásoba živín je bezpečne prístupná [10]. Fyzikálne vlastnosti polyhydroxyalkanoátových polymérov, ako teplota sklovatenia, teplota topenia a kryštalizácie sú značne ovplyvňované dĺžkou vedľajších reťazcov a funkčnými skupinami [9].

V závislosti na dostupnom zdroji uhlíka a mikrobiálnom kmeni môžu mať PHA podobu od kryštalických termoplastov až po flexibilné elastoméne latexy. Ich materiálové vlastnosti sú značne závislé na monoménernej jednotke, tvoriacej biopolymér a nachádzajú sa v tabuľke 2.1. Kryštalické termoplasty s krátkymi reťazcami (scl) pozostávajú z monomérnych jednotiek zložených z 3 až 5 atómov. Elastoméne PHA so strednou dĺžkou reťazca (mcl) pozostávajú z 6 až 14 uhlíkových monomérov [11].

Tab. 2.1: Zhrnutie vlastností PHA [12]

Veličina	Značka	Jednotky	Hodnoty
Teplota sklovitého prechodu	T_g	° C	2
Teplota topenia	T_m	° C	160-175
Stupeň kryštalinity	X_{cT}	%	40-60
Youngov modul pružnosti	E	GPa	1-2
Pevnosť v ťahu	σ	MPa	15-40
Ťažnosť pri pretrhnutí	ε	%	1-15

Ako zásoba v podobe PHA bolo identifikovaných viac ako 100 rôznych monomerných jednotiek, čo vytvára možnosť produkcie mnohých typov biodegradovateľných polymérov s rozsiahlou škálou vlastností. Molekulárna hmotnosť PHA sa nachádza v rozmedzí 50 000 až 1 000 000 Da. Všetky monomérne jednotky sú v D (-) konfigurácii, čo odpovedá stereošpecifickosti biosyntetických enzýmov [8].

2.2.2 Biosyntéza

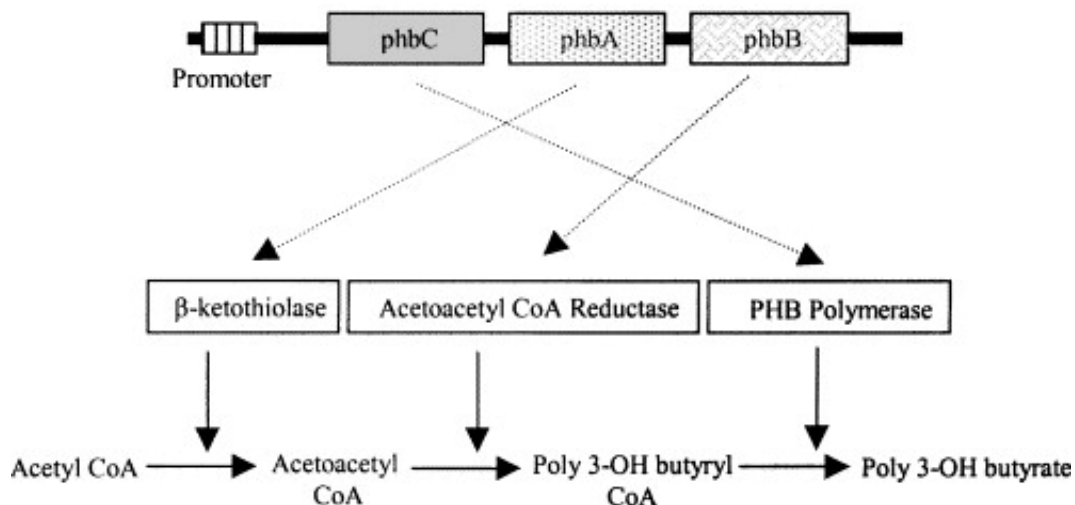
Po rokoch výskumu je k dispozícii už jasný obraz o tom, že príroda rozvinula mnoho rozličných metabolických dráh tvorby PHA, každá z nich typická pre daný mikroorganizmus. Genetické štúdie priniesli nový pohľad na reguláciu tvorby PHA s ohľadom na podmienky rastu. Primárna rola centrálneho metabolizmu a fyziológie bunky začala byť zrozumiteľná štúdiom PHA mutantov. Tieto štúdie osvetlili fyziológiu mikroorganizmu a zaopatрили tým silný nástroj navrhovania a konštruovania rekombinovaných organizmov na produkciu PHA. Prvý polyhydroxyalkanoát, ktorý bol objavený a zároveň doteraz najviac študovaný je polyhydroxybutyrát (PHB).

Na obrázku 2.2 možno vidieť biosyntetickú dráhu baktérie *C. necator*. Táto biosyntetická dráha polyhydroxybutyrátu je zložená z troch enzymatických reakcií, ktoré sú katalyzované tromi rôznymi enzýmami.

Prvá reakcia pozostáva z kondenzácie dvoch molekúl acetylCo A na acetoacetylCo A pomocou β -ketoacylCo A 3-ketothiolázy (kódovaná phbA).

Druhá reakcia je redukcia acetoacetylCo A na (R)-3-hydroxybutyrylCo A. Enzým, ktorý túto reakciu katalyzuje je NADH dependentná acetoacetylCo A dehydrogenáza (kódovaná phbB). Monoméry (R)-3-hydroxybutyryl-CoA sú potom polymerizované na polyhydroxybutyrát enzýmom poly(3-hydroxybutyrát) polymerázou (kódovaná phbC).

Počas normálneho bakteriálneho rastu je enzým 3-ketothioláza inhibovaný voľným koenzýmom A, ktorý vychádza z Krebsovho cyklu. Pokiaľ je vstup acetylCo A do Krebsovho cyklu obmedzený, čo sa deje počas limitácie neuhlíkových živín, nadbytok acetylCo A je usmerňovaný do biosyntézy polyhydroxybutyrátu [10]. Ako možno vidieť na obr. 2.2 polyhydroxybutyrát je syntetizovaný postupným pôsobením β -ketoacyl-CoA thiolázy (phbA), acetoacetyl-CoA reduk-



Obr. 2.2: Biosyntetická dráha poly(3-hydroxybutyrátu) [8]

tázy (phbB) a PHB polymerázy (phbC) v troch krokoch. Gény operónu phbCAB kódujú tieto tri enzýmy. Promotér transkribuje celý operón phbCAB [8].

2.2.3 Biodegradabilita

Polyhydroxyalkanoáty sú schopné degradácie v biologických podmienkach za vzniku produktov neškodných pre životné prostredie. Za aeróbných podmienok sa rozkladajú na oxid uhličitý a vodu, za anaeróbných podmienok na vodu a metán. Sú degradované mikroorganizmami, ktoré obsahujú špecifické degradačné enzýmy nazývané PHA depolymerázy. Doteraz bolo identifikovaných asi 600 rôznych PHA depolymeráz [13].

Väčšina štúdií biodegradácie PHA bola vykonávaná v laboratóriách a boli orientované hlavne na mechanizmus interakcie medzi supramolekulárnou štruktúrou PHA, PHA depolymerizujúcich enzýmov a mikroorganizmov, ktoré sú schopné extracelulárnej sekrécie PHA depolymeráz. Aeróbne a anaeróbne baktérie schopné degradácie PHA boli izolované z rôznych ekosystémov ako je pôda, kompost, sladká a morská voda, čo dokazuje, že PHA degradujúce mikroorganizmy obývajú všetky terestrálné a vodné ekosystémy.

Pôda je neutrálnym prostredím s najväčšou kapacitou pre degradáciu PHA. Avšak väčšina pôdných mikroorganizmov je schopná len degradácie krátkoreťazcových PHA, ktoré nemajú viac ako 5 atómov uhlíka a len niektoré, ktoré dokážu spracovávať aj PHA so strednou dĺžkou reťazca. Degradácia P3HBV v pôde za stálej teploty a vlhkých podmienok bola silne ovplyvnená teplotou. Naproti tomu zmena pH nevykazovala žiadny vplyv. Kopolymérne vzorky vykazovali rýchlejšiu degradáciu ako polyhydroxybutyrát a čím väčší bol podiel 3HV, tým vyššia bola rýchlosť degradácie. Rovnako pri použití PHA depolymerázy *P. lemoignei* bola pozorovaná väčšia rýchlosť degradácie pri použití kopolyméru v porovnaní s polyhydroxybutyrátom [14].

Naopak pri použití depolymerázy *Alcaligenes faecalis* sa ukázalo, že sa rýchlosť rozpadu zvyšovala v poradí poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát), poly(3-hydroxybutyrát), poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát). Rozdielne výsledky poukazujú na to, že v prírodných

podmienkach môžu byť rozdiely v rýchlosti rozpadu PHA zapríčinené rozdielmi medzi depolymerizačnými enzýmami sekrétovanými širokou škálou mikroorganizmov [14].

Huby degradujú PHA aktívnejšie ako baktérie vďaka ich mobilite depolymerázy. Sú to napríklad rody: *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes*, *Zygomycetes* a *Micomycetes*, *Penicillium*, *Fusarium* a iné. Rody prokaryotických organizmov schopné rozkladu PHA sú napríklad *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Rhodococcus*, *Rhodocyclus*, *Snytrophomonas*, *Ilyobacter*, *Terrabacter*, *Terracoccus*, *Brevibacillus* a iné.

PHA biodegradabilita je ovplyvnená nielen chemickým zložením polymérov a teplotou prostredia ale aj stereokonfiguráciou polyméru, stupňom kryštalinity a molekulovou hmotnosťou. PHA podliehajú pravej biologickej degradácii, ktorá obsahuje bunkové a humorálne metabolické dráhy [14]. PHA nie sú len biodegradabilné, ale aj obnoviteľné aeróbnym aj anaeróbnym spôsobom. Ako bolo spomenuté, za prístupu kyslíka sú PHA degradované na oxid uhličitý a vodu. Oxid uhličitý môže byť pomocou fotosyntézy recyklovaný znovu na PHA. Za anaeróbných podmienok sú PHA degradované na bioplyn bohatý na metán, ktorý môže byť použitý na tvorbu poly(3-hydroxybutyrátu) za aktivity metanotropných baktérii [15].

2.2.4 Mikrobiálna produkcia

Existuje viac ako 300 druhov mikroorganizmov, ktoré sú schopné akumulácie polyhydroxyalkanoátových polymérov. Len niekoľko z nich je vhodných na syntézu, ktorá by bola dostačujúca pre produkciu na priemyselnej úrovni. Sú to napríklad *C. necator*, *Methylobacterium organophilum*, *Pseudomonas olovorans*, *Aeromonas latus* *Protomonas extorquens*, *Azobacter vinelandii*, *Paracoccus denitrificans* a rekombinantná *E. coli* [9].

Produkcia PHA môže byť optimalizovaná pomocou rekombinácie. Prirodzene PHA produkujúce baktérie majú väčšinou dlhú generačnú dobu a relatívne nízku optimálnu teplotu rastu. Baktérie ako napríklad *E. coli* nie sú schopné syntetizovať alebo degradovať PHA, ale na druhej strane rastú rýchlo pri vysokej teplote a je ľahké ich štiepiť. Rýchly rast umožňuje akumuláciu veľkého množstva polyméru a purifikácia PHA granúl je jednoduchšia a lacnejšia [8].

Takto rekombinovaná baktéria *E. coli* je využívaná na vysokú produkciu PHA [16]. Keďže *E. coli* dokáže utilizovať rôzne uhlíkové zdroje, počnúc glukózou, sacharózou, laktózou a xylózou, je možné v rámci znižovania ceny používať lacné substráty ako je melasa alebo hydrolyzát hemicelulózy.

Táto stratégia môže byť teoreticky použitá na akúkoľvek baktériu, ak to má metabolické výhody. V rozvoji bakteriálnej produkcie PHA z lacných uhlíkových substrátov sa vyskytujú dve stratégie. Prvá stratégia predstavuje možnosť vsadenia génov, ktoré umožňujú utilizovať daný nízkonákladový substrát do organizmu, ktorý prirodzene produkuje PHA. Druhá sa naopak zaoberá vsadením génov biosyntézy PHA do mikroorganizmov, ktoré PHA nedokážu prirodzene produkovať, avšak sú schopné spracovávať lacné substráty. V súčasnosti sa zdá sľubnejšia druhá možnosť optimalizácie mikrobiálnej produkcie [8].

Bakteriálne produkovaný polyhydroxybutyrát a ostatné PHA majú dostatočne veľkú molekulovú hmotnosť na to, aby mali polymérne vlastnosti, ktoré sú podobné konvenčným plastom

ako je napríklad polypropylén. Spomedzi PHA je najlepšie známa charakteristika poly(3-hydroxybutyrátu) [12].

Kopolyméry polyhydroxybutyrátu môžu byť formované viacerými producentmi a môžu priniesť výsledné polyméry, ktoré obsahujú 3-hydroxyvalerátové (3HV) alebo 4-hydroxybutyrátové monomérmé jednotky. Začlenením 3-hydroxyvalerátu do polyhydroxybutyrátu (3HB) vzniká poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát) (3HBV), ktorý je poddajnejší a vykazuje vyššiu krehkosť než poly(3-hydroxybutyrát) [12].

Zloženie výsledného polyhydroxyalkanoátu podlieha rovnako typu produkujúceho mikroorganizmu ako aj zloženiu použitého substrátu. Polyhydroxyalkanoáty sú produkované z širokého množstva rôznych typov substrátov. Je snaha využívať substráty z obnoviteľných zdrojov ako sú sacharóza, škrob, celulóza a triacylglyceroly. Používajú sa ale aj fosílné zdroje ako je metán, minerálny olej, hnedé a čierne uhlie. Medzi dôležité substráty patria odpadové vedľajšie produkty ako melasa, srvátka a glycerol ale aj zlúčeniny ako kyselina propiónová a oxid uhličitý [9].

Cena produktu úzko súvisí s cenou substrátu a závisí na nej miera komerčnej aplikácie a využitia. Cena PHA pri použití prirodzene produkujúceho *A. eutrophus* sa pohybuje okolo 16 USD/kg, čo je v prepočte približne 385 Kč. Bohužiaľ, je to 18krát drahšia alternatíva ako klasický polypropylén. Vďaka rekombinantnej baktérii *E. coli* využitej pri produkcii PHA je možné cenu zredukovať na 4 USD/kg, čo je 96 Kč za kilogram. Táto cena sa už približuje cene iných biodegradabilných materiálov ako PLA a alifatické polyester. Obchodná cena, ktorá by bola realizovateľná sa pohybuje od 3-5 USD/72-120 Kč [9].

2.2.5 Optimalizácia produkcie

Vedci sa v rámci optimalizácie mikrobiálnej produkcie snažia dosiahnuť dvoch kľúčových bodov. Jedným z nich je dlhodobá stabilita produkujúcich kmeňov. Druhým je využitie nenákladných surových materiálov ako zdroj uhlíka na mikrobiálny rast a biosyntézu PHA.

Možnosti priblížiť sa stabilite mikrobiálnych kmeňov ponúka génové inžinierstvo, ktoré je schopné včleniť do genetickej výbavy bunky gény napríklad pre rezistenciu voči možným mikrobiálnym kompetitívnym kmeňom.

Sľubnejšiu cestu predstavuje implementácia robustných produkčných kmeňov, ktoré je možné kultivovať iba v ich presne definovanej nike, charakterizovanej extrémnou salinitou, teplotou, koncentráciou substrátu alebo hodnotou pH. Procesy využívajúce podobné kmene je možno uskutočňovať bez potreby génového inžinierstva, bez antibiotických suplementov a potreba sterilizačných opatrení je minimalizovaná. Škála využiteľných substrátov je stále obohacovaná o často sa vyskytujúce, na uhlík bohaté odpadové priemyselné substráty, ktoré možno využiť ako zdroj potravy pre produkciu PHA. Sú to nutrične obohatená laktóza zo srvátky, hydrolyzáty srvátky a lignocelulóзовých materiálov, škrob z rôznych zdrojov a tiež odpadové tuky [17].

2.3 Halofilné organizmy

Počas posledných 30 rokov bolo objavené veľké množstvo organizmov žijúcich v podmienkach, ktoré je možné nazvať extrémnymi. Charakterizuje ich nízka alebo vysoká teplota, krajné hodnoty pH, vysoká salinita alebo tlak. Extrémofily pre svoj rast extrémne podmienky nie len tolerujú ale vyžadujú [18]. Extrémofily, ktoré si v poslednej dobe pritiahli v súvislosti s produkciou polyhydroxyalkanoátov značnú pozornosť sú halofilné organizmy, ktoré sa vyznačujú vysokou salinitou prirodzeného prostredia.

Halofilné organizmy obývajú slané jazerá ako je Mŕtve more, Veľké Soľné jazero v Utahu a soľné polia, na ktorých je soľ získavaná odparovaním z morskej vody, ktorej hladina je veľmi nízka [19].

Jazerá sú často zafarbené do červeno-ružova hustými kolóniami mikroorganizmov produkujúcich pigment, najmä halofilnými archeónmi. Do prostredia vhodného pre halofilné organizmy patria aj slané potraviny a pôdy.

Halofily možno nájsť v rámci troch domén formy života, ako baktérie, archeóny a eukaryoty. Niektoré, ako napríklad baktéria *Halomonas elongata* sú schopné adaptácie na život v rámci širokej škály koncentrácie soli, zatiaľ čo iné, ako archeóny *Halobacteriales* sú schopné žiť iba v takmer nasýtených soľných roztokoch a nie sú schopné rastu alebo dokonca podliehajú úhynu pod 15 až 20 % soli [18].

Halofilné organizmy môžu byť rozdelené do štyroch skupín podľa nárokov na koncentráciu soli pre optimálny rast:

- Slabé halofily (vyžadujú 3 % NaCl),
- Stredné halofily (3-5 % NaCl),
- Extrémne halofily (25 % NaCl),
- Superextrémne halofily (najmenej 25 % NaCl).

Na získavanie energie všetky aeróbne baktérie využívajú elektrón transportný reťazec – dýchací reťazec, ktorý im umožňuje transformovať elektróny vďaka systému transportných proteínov na kyslík, ktorý je ich ultimátny akceptor. Takto vytvorená energia je skladovaná vo forme ATP. Keďže halofilné organizmy žijú väčšinou v prostredí s nízkym alebo nulovým obsahom kyslíka, museli si vytvoriť mechanizmus transportujúci elektróny na iné akceptory, väčšinou sulfáty alebo nitráty. Pokiaľ tieto zlúčeniny chýbajú, začnú fermentovať jednoduché organické zlúčeniny. Proces konverzie nitrátu na plynnú formu dusíka je biologickým procesom, preto kritické parametre, ktoré ovplyvňujú rast mikroorgaizmu a ich schopnosť odstraňovať nitráty zahŕňajú teplotu, pH, koncentráciu NaCl a teda osmotický potenciál roztoku. Ďalším faktorom je prídavok nutrientov ako sú organické uhlíkové zlúčeniny, vápnik, horčík, draslík, sodík, meď, molybdén a ióny železa [19].

Vysporiadať sa s osmotickým stresom, ktorý je zapríčinený vysokou koncentráciou soli umožňujú dve fundamentálne odlišné stratégie. Prvá, využívaná halofilnými archeónmi a skupinou

anaeróbných halofilných baktérii zahrňuje akumuláciu anorganických solí, najmä KCl vo vlastnej cytoplazme [18]. Tento osmoregulačný mechanizmus vyžaduje špeciálnu adaptáciu intracelulárnych enzýmov, ktoré musia zostať aktívne aj v prítomnosti vysokej koncentrácie soli [19]. Najčastejšie sú to draselné a menej často sodné katióny, z aniónov sú to chloridové ióny. V halofilných archeónoch je koncentračný gradient sodných iónov, prechádzajúcich cez cytoplazmatickú membránu vytváraný aktivitou Na^+/H^+ antiportného transportného systému. Energia potrebná na sodnú pumpu von z bunky je nahradená protónovým gradientom vytvoreným počas elektrónového transportu v dýchacom reťazci alebo protónovou pumpou poháňanou svetlom dependentným bakteriorodopsínom. Draselné ióny pravdepodobne vstupujú do bunky pasívne ako odozva na membránový potenciál [20].

V halofilných archeónoch boli identifikované dva vnútorné chloridové transportéry, prvý halorodopsín je svetlo dependentný a druhý je pravdepodobne poháňaný symportom so sodnými katiónmi. Prítomnosť anorganických iónov v cytoplazme v 4M KCl a viac ako 5M NaCl roztokoch vyžaduje adaptáciu intracelulárnych a extracelulárnych proteínov a enzýmových systémov. Tieto proteíny sú charakterizované nadbytkom záporne nabitých aminokyselín (viac ako 20 % všetkých zvyškov) na ich povrchu, čo pomáha interakciám s okolitým prostredím a zabraňuje precipitácii proteínov halofilných organizmov [20]. Výhodná je vysoká koncentrácia glutamátu, pretože glutamát má najväšiu kapacitu viazať vodu zo všetkých aminokyselín, čo umožňuje udržiavať hydratačný obal [19]. Vysoká koncentrácia soli je potrebná na udržanie slabých hydrofóbných interakcií, preto je väčšina proteínov halofilných archeónov je rapídne denaturovaná a disociovaná v menej koncentrovaných ako 1M roztokoch NaCl a KCl. Táto denaturácia je ireverzibilná [20].

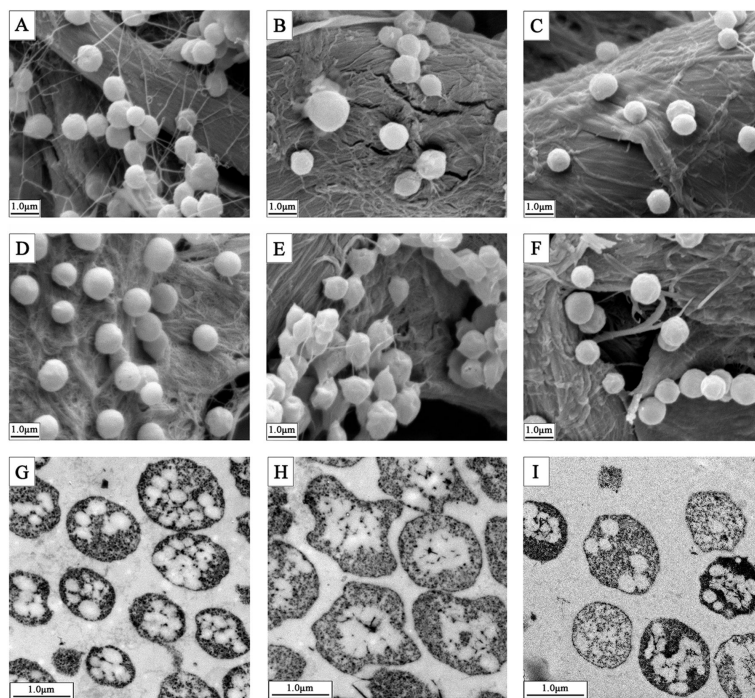
Keďže soľ má za účinok znižovanie aktivity vody, enzýmy halofilných archeónov sú dôležité biokatalyzátory a pre ich potenciál rastie ich atraktívnosť vo vedeckých odboroch [20]. Špeciálne vlastnosti proteínov halofilných organizmov sú ilustrované v nedávnej štúdii o glutamát dehydrogenáze *Halobacterium salinarium*, kde bol porovnávaný model enzýmu v jeho primárnej štruktúre s inými glutamát dehydrogenázami. Bolo možné pozorovať povrch proteínu halofilu, ktorý je pokrytý zvyškami kyselín. Tento príklad potvrdil, že práve interakcie medzi kyselinovými zvyškami na proteínovom povrchu boli hlavným faktorom destabilizácie v podmienkach s nízkou salinitou [18].

Druhá stratégia, ktorá ponúka možnosť adaptácie na život vo vysokej salinite je realizovaná vo väčšine halofilných baktérii, eukaryotoch, plesniach a halofilných metanogénnych archeónoch. Predstavuje udržanie cytoplazmy s nízkou koncentráciou solí ale s vysokým obsahom vo vode rozpustných organických zlúčenín. Organické osmoticky kompatibilné zlúčeniny zabezpečujú osmotickú rovnováhu, a tým umožňujú aktivitu konvenčných enzýmov, ktoré nie sú adaptované na vysokú salinitu [21]. Môžu pôsobiť stabilizačne a umožňovať bunkám adaptáciu nie len v prípade vysokej salinity prostredia, ale aj vysokej a extrémne nízkej teploty a dehydratácie [22]. Osmoticky kompatibilné zlúčeniny sú vo vode dobre rozpustné polárne molekuly, ktoré sú za fyziologického pH nenabité alebo nabité neutrálne. Príkladmi sú glycerol, glycín a betaín. Ich intracelulárne interakcie sú regulované podľa koncentrácie soli vonkajšieho prostredia [18].

Použitie organických osmoticky kompatibilných zlúčenín poskytuje vysoký stupeň flexibility a adaptability buniek halofilných organizmov. Osmoticky kompatibilné zlúčeniny vytvárajú silnú vodnú štruktúru. Stabilizujú proteíny prevenciou voči foldingu, ktorý by bol spôsobený zahrievaním, mrazením a sušením [18].

2.3.1 PHA produkcia pomocou *Haloferax mediterranei*

Haloferax mediterranei je extrémne halofilný striktno aeróbný organizmus, archeón, ktorý spadá pod rod *Halobacteriaceae*. Tento kmeň bol prvýkrát izolovaný zo soľných polí blízko Alicante v Španielsku a bol použitý na niekoľko štúdií. *Haloferax* rastie rýchlejšie ako väčšina halofilných archeónov a preukazuje značnú metabolickú zdatnosť a stabilitu genómu vo vysokých koncentráciách soli. *Haloferax mediterranei* bol tiež skúmaný ako producent polyhydroxyalkanoátov [23].



Obr. 2.3: *Haloferax mediterranei* v exponenciálnej, stacionárnej fázi [24].

Najprv bol označený za producenta poly(3-hydroxybutyrátu) ale najnovšie štúdie ukázali, že akumuluje kopolymér poly(3-hydroxybutyrát-ko-3-hydroxyvalerát) (PHBV) bez suplementcie média 3-hydroxyvalerátovými prekursorami [23]. Poly(3-hydroxybutyrát) patriaci medzi scl PHA, je semikryštalický izotaktický polymér s R konfiguráciou, ktorá zabezpečuje vysokú degradabilitu. Je pevný a krehký kvôli rekryštalizácii, ktorá prebieha so starnutím materiálu pri izbovej teplote. [12] Kopolymér PHBV je flexibilnejší a poskytuje širšie možnosti aplikácie ako napríklad ako materiál pre medicínske aplikácie alebo baliaci materiál [22].

Popri glukóze boli skúmané možnosti alternatívnych substrátov, ktoré by boli nenákladnými zdrojmi uhlíka na tvorbu P(3HB-co-3HV). Napríklad škrob, extrudovaný kukuričný škrob, extrudované ryžové a pšeničné otruby, glycerol a hydrolyzovaná srvátka. Využitie takýchto odpadových substrátov na produkciu PHA môže napomôcť optimalizácii ceny procesu, ktorý by bol následne schopný konkurovať iným komerčným produkciám biopolymérov.

Haloferax mediterranei vyžaduje koncentráciu soli pre optimálny rast 22 %. V takýchto podmienkach je rast iných nehalofilných organizmov málo pravdepodobný, čo umožňuje uskutočniť proces bez striktných sterilizačných zámkov a napomáha zníženiu rizika nechcenej kontaminácie. Súhrn týchto charakteristík ponúka nižšiu výslednú cenu produkcie.

Ďalšou z výhod produkcie PHA pomocou organizmu *Haloferax mediterranei* je jednoduchosť izolácie polyméru hypoosmotickým šokom buniek znížením salinity externého média. Downstream processing izolácie polyméru, ktorý zvyčajne zahŕňa narušenie bunečnej membrány, separáciu polyméru z bunečných zostatkov a nakoniec purifikáciu polyméru je značne zjednodušený, čo odpovedá redukcii celkovej ceny produkcie až o 40 % [23].

2.4 Exopolysacharidy

2.4.1 Charakteristika

V polovici 19. storočia bol objavený polysacharid vo víne, neskôr poznaný ako dextrans. Prokaryotický organizmus zodpovedný za jeho tvorbu je *Leuconostoc mesenteroides*. Postupne boli objavené ďalšie typy polysacharidov produkovaných mikroorganizmami ako celulóza, alginát a xantán [25].

Exopolysacharidy sú polyméry s vysokou molekulovou hmotnosťou vylučované baktériami do okolitého prostredia. Ich molekulová hmotnosť sa pohybuje v rozmedzí 10 až 1000 kDa. Syntézu sprostredkujú enzýmy, ktoré sú lokalizované v bunkovej stene [26]. EPS zvyčajne pozostávajú z monosacharidov a necukorných substituentov ako sú napríklad pyruvát, acetát, fosfát a sukcinát. Môžu mať homopolymérnu alebo heteropolymérnu konfiguráciu, ktorú je možné zistiť pomocou hydrolýzy. Homopolysacharidy hydrolýzou poskytujú iba jeden typ monosacharidových jednotiek. Medzi ne patrí celulóza, alginát alebo dextrans. Naopak heteropolysacharidy obsahujú viac typov monosacharidových jednotiek, sú zložené z opakujúcich sa jednotiek, od disacharidov až po heptasacharidy. Príkladmi sú xantán, kyselina hyalurónová alebo heparín [26]. Homopolysacharidy a heteropolysacharidy sa nelíšia len v chemickej štruktúre a väzbách ale najmä v enzýmoch sprostredkujúcich syntézu a lokalizácie jej priebehu [25].

Polysacharidové komponenty sú z extracelulárnych biopolymérov najhojnejšie a mikroorganizmy ich produkujú široké spektrum. Niektoré z nich majú rovnakú funkciu, zatiaľ čo iné sú špecifické pre daný druh mikroorganizmu a zastupujú úplne rozdielne biologické funkcie. Fyzikálne a chemické podmienky ako pH, teplota, čas inkubácie a zloženie média hrajú dôležitú rolu vo výslednom množstve vyprodukovaných polysacharidov [25].

Exopolysacharidy sú rozdeľované podľa výskytu a následnej funkcie v bunke. V bunkovej stene slúžia na štruktúrne a ochranné účely. Vytvárajú kovalentne viazaný kohézny povrch, morfológicky nazývaný kapsula. Vylučované do vonkajšieho prostredia majú funkciu vytvárania sliozového povrchu. Tieto kapsule často spôsobujú priľnavosť buniek na rôzne povrchy a dodávajú baktériálnym kolóniám, kultivovaným na agarových médiách v laboratóriách mukózný charakter. Prirodzené zloženie kapsulárnych polysacharidov je veľmi závislé na kmeni mikroorganizmov, a štruktúrnú diverzitu možno pozorovať na skutočnosti, že len samotná *E.coli* produkuje osem rozdielnych typov. Kapsule majú široké množstvo funkcií, zahrňujúc adhézne receptory počas kolonizácie alebo funkciu prostriedku proti vysušovaniu vďaka schopnosti priťahovať vodu. Sú zodpovedné za rezistenciu voči niektorým fágom a stavovcom.

Exopolysacharidy sú kategorizované podľa funkcie do rôznych kategórií. Sú to napríklad stavebné a štruktúrne, sorpčné, povrchovo aktívne. Medzi stavebné exopolysacharidy patria neutrálné polysacharidy slúžiace na stavebné účely schopnosťou ľahšieho udržiavania vody a ochrany

bunky. Povrchovo aktívne exopolysacharidy zahŕňajú molekuly, ktoré sa správajú amfifilne, majú rôzne povrchové vlastosti. Môžu byť súčasťou tvorby biofilmu a poskytovať antibakteriálnu a fungicídnu schopnosť danej bunke. Sorpčné exopolysacharidy sú zložené z nabitých polymérov, ktorých funkcia je sorpcia na iné nabité molekuly zahŕňajúc interakcie s bunčným povrchom [25].

Väčšina funkcií exopolysacharidov produkovaných mikroorganizmami je spojená s ochranou samotného produkujúceho mikroorganizmu. Mikroorganizmy majú v záujme obaliť sa vysoko hydratovanou exopolysacharidovou vrstvou, ktorá ich môže ochrániť pred vysychaním a ulovením protozoami. Prítomnosť exopolysacharidov okolo povrchu ich bunky má tiež za následok ich difúzne vlastnosti. Majú tiež schopnosť ochraňovať bakteriálne bunky pred ťažkými kovmi a majú stabilizačné, vysoko viskózne, biokompatibilné a biodegradabilné vlastnosti [26].

2.4.2 Aplikácia

Ukázalo sa, že niektoré z veľkého množstva objavených exopolysacharidov majú priemyselný a medicínsky význam so značnou komerčnou hodnotou najmä s ich využitím ako biomateriály alebo modifikátory reologických vlastností vodných systémov. Limitácia aplikácii týchto polysacharidov je závislá na cene produkcie, ktorú je možné optimalizovať výberom cenovo nenáročného substrátu, zmenou kultivačných podmienok a génovou modifikáciou použitých mikrobiálnych kmeňov [25].

Vzhľadom na to, že vlastnosti mikrobiálnych exopolysacharidov sú unikátne a nie je možné ich nájsť v iných tradičných rastlinných polysacharidoch, ich hodnotná možnosť aplikácie a kvalita produktu značne prevyšuje dôležitosť produkčnej ceny. Do možností aplikácie patrí využitie bakteriálneho alginátu na bunkovú mikroenkapsuláciu, výrovu liekov alebo ako aktívna prísada do absorbentov. Sulfátovaná forma alginátu slúži ako antikoagulant, s účinkami proti trombóze, arterioskleróze, tvorbe metastáz a zápalových procesov [25].

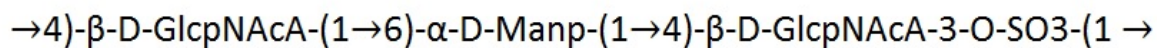
Xantánová guma produkovaná *Xanthomonas campestris* má široké priemyselné využitie v potravinárstve, kozmetike ale aj vo farbách na vodnej báze. Vykazuje výborné reologické vlastnosti vo vodných roztokoch a preto je používaný ako stabilizátor rôznych emulzií a suspenzií. V poľnohospodárskom priemysle je využívaný na zlepšenie tokových vlastností herbicídov a insekticídov [25].

2.4.3 Syntéza EPS pomocou *Haloferax mediterranei*

Halofilné archeóny obsahujú vo svojej cytoplazme vysokú koncentráciu anorganických iónov, ktoré slúžia namiesto organických kompatibilných zlúčenín, ktoré akumuluje väčšina halofilných baktérií na vyrovnanie sa s osmotickým stresom. *Haloferax mediterranei* produkuje značné množstvo exocelulárnych polymérnych substancií, ktoré dávajú kolónii typický mukózný charakter. EPS boli čiastočne charakterizované ako acidické exopolysacharidy. Podľa publikácie od Haralambos Parolis [27], ktorý je jedným z autorov, bola pomocou plynovej rozdelovacej chromatografie indikovaná v štruktúre manóza ako jediný neutrálly cukor v polyméri.

Bolo zistené, že EPS sú zložené z pravidelne sa opakujúcej trisacharidovej jednotky, ktorá obsahuje jednu manózu a dve 2-acetoamido-2-deoxyglukurónové kyseliny. Prítomnosť esteru sul-

fátu bola demonštrovaná pomocou IR spektroskopie a chemických analýz. Bola objavená silná absorpčná skupina $S = O$. Množstvo prítomného sulfátu je odhadované na 0,98 mol na 1 mol trisacharidovej opakujúcej sa jednotky. Ďalej bola analyzovaná frakcia trisacharidu a bolo zistené, že odpovedá zmesy sulfátovaných a nesulfátovaných trisacharidov [27].



Obr. 2.4: Štruktúra EPS produkovaných mikroorganizmom *Haloferax mediterranei* [27].

3 PRAKTICKÁ ČASŤ

3.1 Materiály a metody

3.1.1 Použité chemikálie

Tab. 3.1: Použité chemikálie

3,5-dinitrosalicylová kyselina		Sigma Aldrich (SRN)
Albumín		Serva
Anthron		Sigma Aldrich (SRN)
Bromid sodný	NaBr	Lachema (ČR)
Citronan amonno-železitý	$\text{NH}_4\text{Fe}^{\text{III}}\text{citrát}$	Fluka
Chlorid draselný	KCl	Onex (ČR)
Chlorid sodný	NaCl	Lachema (ČR)
Chlorid vápenatý dihydrát	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Lachema (ČR)
Chloroform	CHCl_3	VWR Prolabo Chemicals
Etanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	Lach-Ner (ČR)
Fenol	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$	PA kvalita
Glukóza monohydrát	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Lach-Ner (ČR)
Glycerol	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	PA kvalita
Hydrogenuhlíčitan sodný	NaHCO_3	Lach-Ner (ČR)
Hydroxid sodný	NaOH	Lach-Ner (ČR)
Kvasnicový extrakt		HIMEDIA, India
Kyselina sírová 96%	H_2SO_4	Lach-Ner (ČR)
Manóza	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$	Sigma Aldrich (SRN)
Methanol	CH_3OH	VWR Prolabo Chemicals
Poly3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát	P(3HB-co-3HV)	Sigma Aldrich (SRN)
Siran hořečnatý heptahydrát	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Lach-Ner (ČR)
Vínan sodno-draselný tetrahydrát	$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Lachema (ČR)
Xylóza	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$	Sigma Aldrich (SRN)

3.1.2 Použité prístroje

Tab. 3.2: Použité prístroje

Plynový chromatograf	
-Trace GC Ultra FID detector	
-Kolóna-DB-WAX 30 m by 0,25 mm	
Nanofotometer	Implen
Analytické váhy	Boeco
Laminárny box Aura mini	Bio air instrument
Termostat blokový SBH-200D	Stuart
Vodný kúpeľ	Julabo TW2
Centrifúga U-32R	Boeco
Centrifúga Sigma	Sartorius
Predvážky	EW 620, Kern
Orbital Shaker-incubator ES-20	Biosan
Inkubátor	Hiedolph
Vortex TK3S	techno Kartell
pH Tester 30	Vitrum
Běžné laboratorné sklo a pomôcky	

3.2 Kultivácia *Haloferax mediterranei*

3.2.1 Živné médium

Inokulum a následné produkčné médium bolo pripravované s použitím živného média o zložení nachádzajúcom sa v tabuľke 3.3.

Tab. 3.3: Zloženie živného média

Látka	m [g]	V [ml]
NaCl	150	
MgCl ₂	13	
CaCl ₂	0,69	
KCl	4	
NH ₄ Fe ^{III} citrát	0,63	
MgSO ₄	20	
NaHCO ₃	0,25	
NaBr	0,5	
Kvasničný extrakt	6,25	
SL6		1,25
Destilovaná voda		1000

Tab. 3.4: Zloženie roztoku stopových prvkov SL6

Látka	m [g]	V [ml]
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,10	
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,03	
H ₃ BO ₃	0,30	
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,20	
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	0,01	
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	0,02	
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,03	
Destilovaná voda		1000

Živné médium bez glukózy a SL6 bolo sterilizované pri teplote 121 °C 20 minút. Po sterilizácii boli pridané komponenty, ktoré chýbali z dôvodu predchádzania karamelizácii glukózy. Pre prípravu média na pevnej fáze (Petriho misky) bol pridaný agar v koncentrácii 20 g/l.

3.2.2 Príprava inokula

Bolo pripravené inokulum kultúry *Haloferax mediterranei* do 50 ml submerzného média (3.3) v Erlenmeyerových bankách o objeme 100 ml. Kultivácia prebiehala 48 hodín na trepačke temperovanej na 37 °C.

3.3 Štúdium vplyvu substrátu na produkciu biopolymérov kultúrou *Haloferax mediterranei*

Do submerzného média s rôznou koncentráciou zvoleného prídavného substrátu bolo očkovaných 10 % inokula. Ako substrát bol použitý olej, hydrolyzát srvátky a hydrolyzát peria. Kultivácia prebiehala na trepačke temperovanej na 37 °C pri 170 rpm počas 96 hodín.

3.3.1 Štúdium vplyvu koncentrácie hydrolyzátu srvátky na produkciu biopolymérov

Bol pripravený hydrolyzát srvátky enzymaticky za prítomnosti 0,5 % proteázy. Hydrolýza prebiehala pri teplote 50 °C počas 24 hodín. *Haloferax mediterranei* bol kultivovaný v Erlenmeyerových bankách o objeme 250 ml a celkovom objeme živného média 100 ml, v ktorom sa nachádzalo 50; 25; 10 % hydrolyzátu srvátky bez pridania glukózy; 10 % hydrolyzátu srvátky s glukózou o koncentrácii 30 g/l. Súčasne kultivácia prebiehala v Erlenmeyerovej banke s objemom média, ktoré obsahovalo jednodruhový kukuričný olej v koncentrácii 20 g/l. Kultivácii predchádzalo očkovanie média 10% inokula. Kultivácia prebiehala na trepačke temperovanej na 37°C pri 170 rpm počas 96 hodín. Po ukončení kultivácie bolo médium s kultúrou *Haloferax mediterranei* podrobené analýze. Bola stanovená koncentrácia biomasy, koncentrácia EPS, reziduálnych redukujúcich sacharidov a obsah PHA v biomase.

3.3.2 Štúdium vplyvu koncentrácie hydrolyzátu peria na produkciu biopolymérov

Pre prípravu hydrolyzátu peria bolo do Erlenmeyerovej banky o objeme 250 ml prevedených 100 ml roztoku NaOH o koncentrácii 0,5 mol/dm³ a bolo pridaných 6 g nastrihaného hydri nového peria. Obsah Erlenmeyerovej banky o výslednej koncentrácii 60 g/l peria bol dôkladne premiešaný, uzavretý zátkou a umiestnený do mikrovlnnej rúry na 7 minút. Po ukončení hydrolýzy bola zmes prefiltrovaná za zníženého tlaku cez Büchnerov lievnik. Filtrát bol zneutralizovaný koncentrovanou kyselinou sírovou. Takto pripravený hydrolyzát peria bol použitý ako substrát.

Haloferax mediterranei bol kultivovaný v Erlenmeyerových bankách o objeme 250 ml a celkovom objeme živného média 50 ml, v ktorom sa nachádzalo 50; 25; a 10 % hydrolyzátu peria bez pridania glukózy a 10 % hydrolyzátu peria s glukózou o koncentrácii 30 g/l. Kultivácii predchádzalo očkovanie média bunkami z inokula. Bunky boli získané centrifugáciou 10 ml média inokula. Kultivácia prebiehala na trepačke temperovanej na 37°C pri 170 rpm počas 96 hodín. Po ukončení kultivácie bolo médium s narastenou kultúrou *Haloferax mediterranei* podrobené analýze.

Bola stanovená koncentrácia biomasy, koncentrácia EPS, reziduálnych redukujúcich sacharidov a celulárnych proteínov a obsah PHA v biomase.

3.3.3 Štúdium vplyvu objemu média na produkciu biopolymérov

Bol pripravený hydrolyzát peria podľa postupu v podkapitole 3.3.2. V troch Erlenmeyerových bankách o objeme 250 ml sa nachádzalo médium o objeme 50; 100; 150 ml s obsahom 10% hydrolyzáta peria bez glukózy v živnom médiu. V ďalších troch Erlenmeyerových bankách o objeme 250 ml sa nachádzalo médium o objeme 50; 100; 150 ml s obsahom 10% hydrolyzáta peria s glukózou v živnom médiu o koncentrácii 30 g/l. Médium bolo zaočkované centrifugovanými bunkami z 10 ml inokula. Kultivácia prebiehala na trepačke temperovanej na 37°C pri 170 rpm počas 96 hodín. Po ukončení kultivácie bolo médium s narastenou kultúrou *Haloferax mediterranei* podrobené analýze. Bola stanovená koncentrácia biomasy, koncentrácia EPS, reziduálnych redukujúcich sacharidov a celulárnych proteínov a obsah PHA v biomase.

3.4 Analýza

3.4.1 Spektrofotometrické stanovenie biomasy

Koncentrácia biomasy vo vzorkách média po ukončení kultivácie bola stanovená turbidimetricky, meraním zákalu proti supernatantu pri vlnovej dĺžke 630 a 520 nm. Supernatant, slúžiaci ako blank bol získaný centrifugáciou vzorky v mikroskúmavke pri 10 000 ot./min 5 minút. Analyzované vzorky boli vhodne nariadené vodným roztokom soli o koncentrácii 100 g/l. Namerané hodnoty optickej hustoty pri $\lambda = 520$ nm odpovedali OD_{520nm} (optical density 520 nm). Jednotka OD_{520nm} je ekvivalentná 0,42 g/l suchej biomasy [28].

3.4.2 Gravimetrické stanovenie biomasy

Koncentrácia biomasy vo vzorkách média po ukončení kultivácie bola stanovená gravimetricky. Vzorka média o objeme 10 ml bola odpipetovaná do plastovej skúmavky a následne centrifugovaná pri 8000 ot./min. 5 minút. Vzniknutý supernatant bol preliaty do čistej uzatvárateľnej plastovej skúmavky a ponechaný na ďalšiu analýzu. Vzniknutý sediment bol premytý vodným roztokom o koncentrácii 150 g/l soli a podrobený centrifugácii pri 10 000 ot./min. 5 minút. Novovzniknutý supernatant bol odstránený a sediment bol sušený pri 74 °C do konštantnej hmotnosti. Vysušený sediment bol vážený na analytických váhach s presnosťou na 4 desatinné miesta.

3.4.3 Stanovenie redukujúcich sacharidov pomocou 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny

Koncentrácia redukujúcich sacharidov v supernatante bola stanovená spektrofotometricky pomocou 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny (DNS) [29]. Supernatant bol získaný centrifugáciou vzorky média po kultivácii, ako je opísané v podkapitole 3.4.2.

Bol pripravený roztok 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny o objeme 200 ml. Boli navážené 2 g DNS a 60 g vínanu sodno-draselného. Bol pripravený roztok NaOH o koncentrácii 2 mol/dm³. Do odmernej banky o objeme 200 ml boli pomocou 100 ml destilovanej vody kvantitatívne prevedené 2 g DNS. Následne bolo pridaných 40 ml roztoku NaOH o koncentrácii 2 mol/dm³. Zmes sa začala zahrievať, čo napomáhalo rozpusteniu DNS. Do banky bolo kvantitatívne prevedených 60 g vínanu sodno-draselného a zmes bola doplnená destilovanou vodou po rysku.

Do sklenených skúmaviek bolo pipetované 0,5 ml vzorky supernatantu a 0,5 ml pripraveného roztoku DNS. Skúmavky boli 10 minút temperované vo vodnom kúpeli na 70 °C. Následne boli umiestnené do tmy a po vychladnutí boli doplnené destilovanou vodou na objem 10 ml. Vzorky boli homogenizované pomocou vortexu a bola meraná ich absorbancia na spektrofotometri pri vlnovej dĺžke 540 nm. Koncentrácia redukujúcich sacharidov bola vypočítaná pomocou kalibračnej krivky (3.4.3.1).

3.4.3.1 Stanovenie kalibračnej krivky

Bol pripravený roztok glukózy o koncentrácii 4 g/l. Jeho pipetovaním 0,5; 1,0 ; 1,5 ; 2,0; 2,5; 3,0 ml do sklenených skúmaviek a doplnením na objem 4 ml destilovanou vodou bol pripravený kalibračný rad. Z každej skúmavky bolo pipetované 0,5 ml a bolo pridané 0,5 ml činidla (roztok DNS 3.4.3). Skúmavky boli následne 10 minút temperované vo vodnom kúpeli na 70 °C a potom presunuté do tmy. Po vychladnutí boli merané pri $\lambda = 540$ nm proti slepej vzorke, ktorá bola pripravovaná súčasne s kalibračným radom, a v ktorej sa namiesto vzorky nachádzala destilovaná voda.

3.4.4 Stanovenie celulárnych proteínov Hartree-Lowryho metódou

Koncentrácia celulárnych proteínov vo vzorkách média po ukončení kultivácie bola stanovená pomocou Hartree Lowryho metódy stanovenia proteínov [30]. Boli pripravené roztoky A, B a C.

Pre prípravu roztoku A bolo do odmernej banky o objeme 100 ml kvantitatívne prevedených 200 mg vínanu sodno-draselného a 10 g Na₂CO₃ pomocou 50 ml roztoku NaOH o koncentrácii 1 mol/dm³. Objem banky bol doplnený po rysku destilovanou vodou a dôsledne premiešaný do rozpustenia látok v pevnej forme.

Pre prípravu roztoku B boli do odmernej banky o objeme 50 ml kvantitatívne prevedené 2 g vínanu sodno-draselného a 1 g CuSO₄ · 5 H₂O pomocou 10 ml roztoku NaOH o koncentrácii 1 mol/dm³. Objem banky bol doplnený po rysku destilovanou vodou a dôsledne premiešaný do rozpustenia látok v pevnej forme.

Pre prípravu roztoku C bolo zriedené Folin-Ciocalteuovo činidlo destilovanou vodou v pomere 1:15. Pre prípravu 64 ml roztoku C boli pipetované 4 ml Folin-Ciocalteuovho činidla a pridaných 60 ml destilovanej vody.

Pre prípravu vzoriek bolo do plastovej skúmavky pipetovaných 10 ml média a následne bol objem skúmavky podrobený centrifugácii pri 8000 ot./min 5 minút. Vzniknutý supernatant bol

preliaty do čistej uzatvárateľnej plastovej skúmavky a ponechaný na ďalšiu analýzu. Vzniknutý sediment biomasy bol suspendovaný v destilovanej vode a bol podrobený disrupcii buniek pomocou ultrazvuku na 20 minút.

Pre vlastné stanovenie vzoriek bol do sklenených skúmaviek pipetovaný 1 ml vhodne nariadeného roztoku vzorky a 0,9 ml roztoku A. Skúmavky boli umiestnené do vodného kúpeľa temperovaného na 50 °C po dobu 10 minút. Po vychladnutí bolo pridaných 0,1 ml roztoku B a skúmavky boli ponechané 10 minút pri teplote laboratória. Následne boli pridané 3 ml roztoku C a skúmavky boli znovu umiestnené do vodného kúpeľa temperovaného na 50 °C po dobu 10 minút. Po vychladnutí bol obsah skúmaviek premiešaný a bola meraná absorbanca pri $\lambda = 550$ nm v 10 mm kremennej kyvete proti slepej vzorke, ktorá bola pripravovaná súčasne so vzorkami a namiesto vzorky obsahovala destilovanú vodu. Koncentrácia celulárnych proteínov vo vzorkách bola vypočítaná pomocou kalibračnej krivky.

3.4.4.1 Stanovenie kalibračnej krivky

Pre prípravu zásobného roztoku albumínu o koncentrácii 0,5 g/l bolo do odmernej banky o objeme 100 ml kvantitatívne prevedených 50 mg albumínu a objem banky bol doplnený po rysku destilovanou vodou. Pre prípravu kalibračného radu bolo do skúmaviek pipetované 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 ml zásobného roztoku albumínu a objem skúmaviek bol doplnený na 1 ml destilovanou vodou. Výsledné roztoky odpovedali koncentráciám albumínu 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30 g/l.

Z každého roztoku bol do sklenenej skúmavky pipetovaný 1 ml a bolo pridané 0,9 ml roztoku A. Skúmavky boli umiestnené do vodného kúpeľa temperovaného na 50 °C po dobu 10 minút. Po vychladnutí bolo pridané 0,1 ml roztoku B a skúmavky boli ponechané 10 minút pri teplote laboratória. Následne boli pridané 3 ml roztoku C a skúmavky boli znovu umiestnené do vodného kúpeľa temperovaného na 50 °C po dobu 10 minút. Po vychladnutí bol obsah skúmaviek premiešaný a bola meraná absorbanca pri $\lambda = 550$ nm v 10 mm kremennej kyvete proti slepej vzorke, ktorá bola pripravovaná súčasne so vzorkami a namiesto vzorky obsahovala destilovanú vodu. Z nameraných hodnôt bola zostrojená kalibračná krivka pre výpočet koncentrácie celulárnych proteínov vo vzorkách.

3.4.5 Stanovenie PHA pomocou GC-FID

Koncentrácia PHA vo vzorkách bola stanovená pomocou plynovej chromatografie s FID detekciou. Pre prípravu vzoriek vhodných na analýzu plynovou chromatografiou bolo pipetovaných 10 ml média do plastových skúmaviek. Objem skúmaviek bol následne podrobený centrifugácii pri 8000 ot./min 5 minút. Vzniknutý supernatant bol preliaty do čistej uzatvárateľnej plastovej skúmavky a ponechaný na ďalšiu analýzu. Vzniknutý sediment bol premytý vodným roztokom o koncentrácii 150 g/l soli a podrobený centrifugácii pri 10 000 ot./min 5 minút. Novovzniknutý supernatant bol odstránený a sediment bol sušený pri 74 °C do konštantnej hmotnosti.

Do krympľovacej vialky bolo na analytických váhach navážených 10 mg vysušenej biomasy s presnosťou na 0,1 mg. Následne bol pridaný 1 ml chloroformu a 0,8 ml interného štandardu (kyselina benzoová v 15% kyseline sírovej a metanole). Vialky boli dôsledne uzatvorené pomocou

krympľovacích kliešťov a boli umiestnené do termostatu temperovaného na 95 °C, kde nasledujúce 3 hodiny prebiehala esterifikácia. Po vychladnutí bol obsah vialiek prevedený do vialiek s väčším objemom a bolo pridaných 0,5 ml roztoku NaOH o koncentrácii 0,05 mol/dm³. Vialky boli uzatvorené a ich obsah bol dôkladne pretrepaný. Po oddelení fáz bolo pipetovaných 0,05 ml zo spodnej organickej fázy a 0,95 ml chloroformu do skrutkovacej vialky o objeme 2 ml. Takto pripravené vzorky boli vhodné pre analýzu pomocou GC-FID. Koncentrácia PHA v biomase bola vypočítaná pomocou kalibračnej krivky.

3.4.5.1 Stanovenie kalibračnej priamky

Pre prípravu štandardného roztoku P(3HB-co-3HV) bola do vialky zvážená granula P(3HB-co-3HV) s presnosťou na 0,1 mg a boli pipetované 4 ml chloroformu. Vialka bola umiestnená do termostatu na 75 °C až do rozpustenia granule.

Pre prípravu kalibračného radu bolo po vychladnutí do krympľovacích vialiek pipetované 0,05; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1 ml štandardného roztoku. Objem bol doplnený na 1 ml chloroformom a bolo pridaných 0,8 ml interného štandardu (kyselina benzoová v 15% kyseline sírovej a metanole). Vialky boli dôsledne uzatvorené pomocou krympľovacích kliešťov a boli umiestnené do termostatu temperovaného na 95 °C, kde nasledujúce 3 hodiny prebiehala esterifikácia. Po vychladnutí bol obsah vialiek prevedený do vialiek s väčším objemom a bolo pridaných 0,5 ml roztoku NaOH o koncentrácii 0,05 mol/dm³. Vialky boli uzatvorené a ich obsah bol dôkladne pretrepaný. Po oddelení fáz bolo pipetované 0,05 ml zo spodnej organickej fázy a 0,95 ml chloroformu do skrutkovacej vialky o objeme 1 ml. Takto pripravené vzorky boli vhodné pre analýzu pomocou GC-FID. Namerané hodnoty boli použité pre zostrojenie kalibračnej krivky a následný výpočet koncentrácie PHA.

3.4.6 Stanovenie EPS gravimetricky

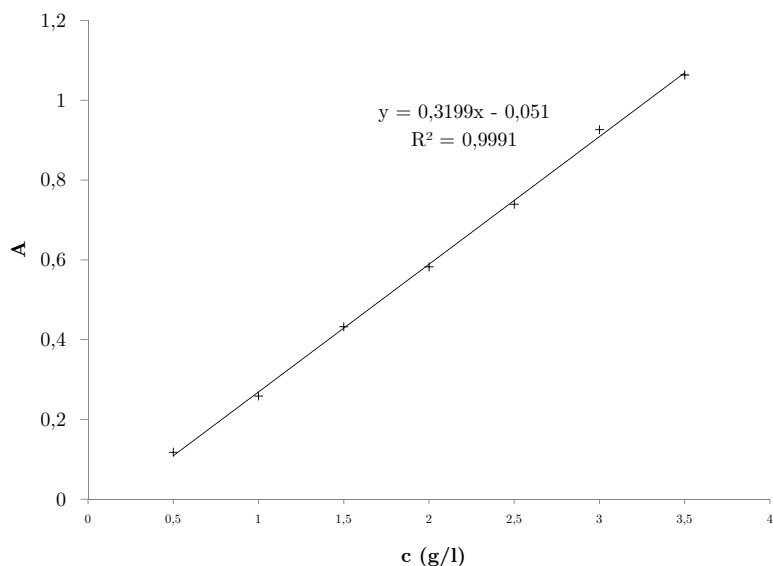
Koncentrácia extracelulárnych polysacharidov vo vzorkách bola stanovená gravimetrickou metódou zrážaním zo supernatantu získaného centrifugáciou biomasy podľa postupu v podkapitole 3.4.2. Do vopred zváženej plastovej skúmavky boli pipetované 3 ml supernatantu a 6 ml etanolu. Po pretrepaní obsahu skúmavky boli vyzrážané extracelulárne polysacharidy. Obsah skúmavky bol podrobený centrifugácii pri 6000 ot./min 5 minút. Novovzniknutý supernatant bol odstránený a sediment EPS bol suspendovaný v destilovanej vode a EPS boli znovu vyzrážané etanolom v pomere 1:2. Objem skúmavky bol znovu podrobený centrifugácii pri 6000 ot./min po dobu 5 minút. Novovzniknutý supernatant bol odstránený a postup prečisťovania bol ešte raz zopakovaný. Vyzrážané EPS boli sušené pri teplote 75 °C do konštantnej hmotnosti a následne zvážené na analytických váhach.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 Kalibrácia metód

4.1.1 Stanovenie koncentrácie redukujúcich sacharidov

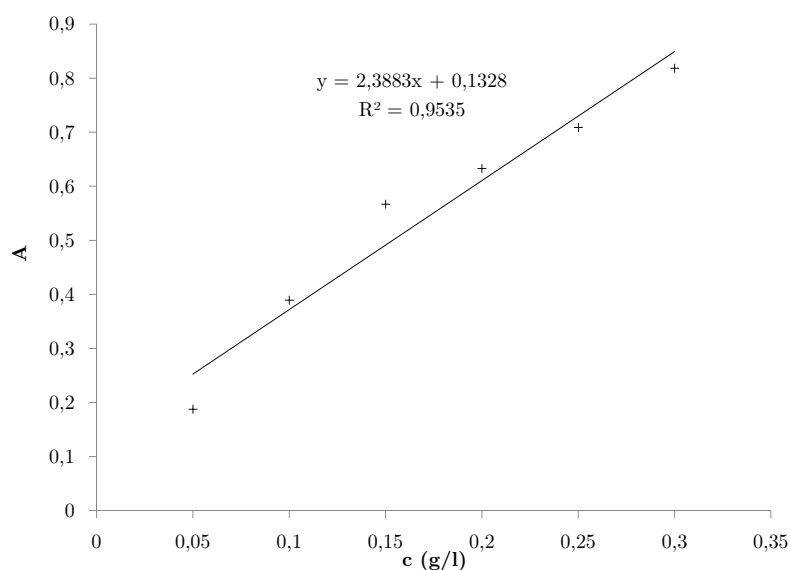
Koncentrácia redukujúcich sacharidov bola stanovená spektrofotometricky pomocou kyseliny 3,5-dinitrosalicylovej. Pre zostavenie kalibračnej krivky bol pripravený štandardný roztok glukózy o koncentrácii 4 g/l. Podrobný postup je možné nájsť v podkapitole 3.4.3.1. Z nameraných hodnôt absorbie pri $\lambda = 540$ nm bola zostavená kalibračná krivka (obr.4.1), ktorej rovnica lineárnej regresie $y = 0,3199x - 0,051$ bola použitá pre výpočet koncentrácie redukujúcich sacharidov vo vzorkách.



Obr. 4.1: Kalibračná krivka závislosti absorbie na koncentrácii redukujúcich sacharidov

4.1.2 Stanovenie koncentrácie celulárnych proteínov

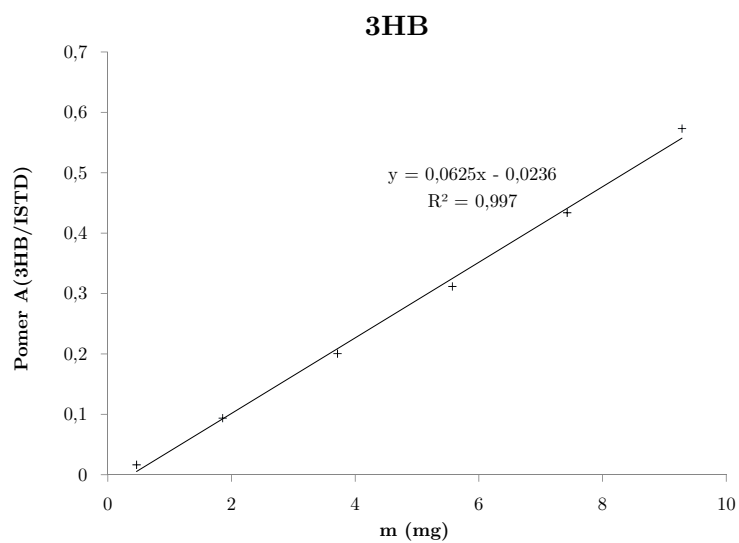
Koncentrácia celulárnych proteínov bola stanovená spektrofotometricky Harthree Lowryho metódou. Pre zostavenie kalibračného radu bol pripravený štandardný roztok albumínu o koncentrácii 0,5 g/l. Podrobný postup je možné nájsť v podkapitole 3.4.4.1. Z nameraných hodnôt absorbie pri vlnovej dĺžke 550 nm bola zostavená kalibračná krivka (obr. 4.2, ktorej rovnica lineárnej regresie $y = 2,3883x + 0,1328$ bola použitá pre výpočet koncentrácie celulárnych proteínov vo vzorkách.



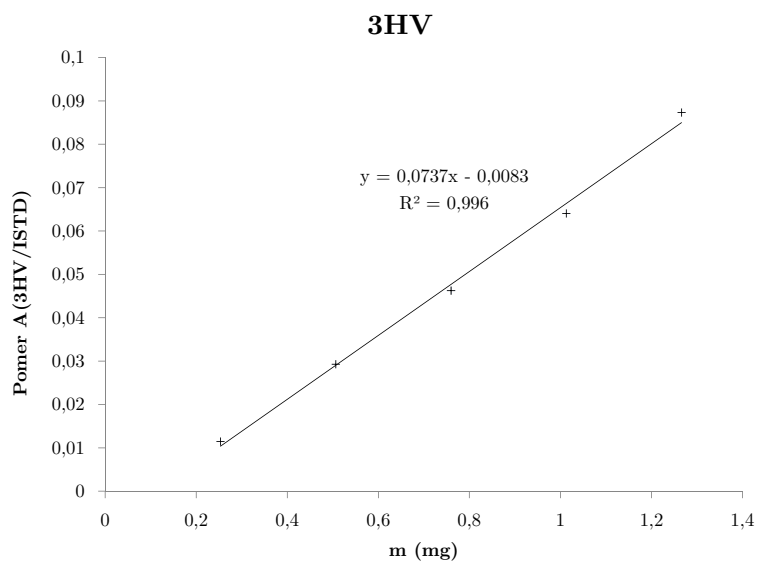
Obr. 4.2: Kalibračná krivka závislosti absorbancie na koncentrácii celulárnych proteínov

4.1.3 Stanovenie koncentrácie PHA

Koncentrácia PHA v biomase bola stanovená pomocou plynovej chromatografie s FID detekciou. Pre zostavenie kalibračného radu bol pripravený štandardný roztok P(3HB-co-3HV). Podrobný postup je možné nájsť v podkapitole 3.4.5.1. Zo závislosti nameraných hodnôt pomerov plôch pík analytu (3HB a 3HV) a interného štandardu (ISTD) na hmotnosti analytu bola zostavená kalibračná krivka (obr. 4.3 a 4.4), ktorej rovnica lineárnej regresie bola použitá pre výpočet koncentrácie 3HB a 3HV vo vzorkách.



Obr. 4.3: Kalibračná krivka závislosti pomeru plôch píkov 3HB a interného štandardu (ISTD) na hmotnosti 3HB



Obr. 4.4: Kalibračná krivka závislosti pomeru plôch píkov 3HV a interného štandardu (ISTD) na hmotnosti 3HV

4.2 Štúdium vplyvu koncentrácie hydrolyzátu srvátky na produkciu biopolymérov

Srvátka je veľkoobjemným odpadným produktom mliekárenskej výroby, ktorý obsahuje predovšetkým širokú škálu aminokyselín a laktózu. Laktóza sa skladá z monosacharidov galaktózy a glukózy, ktoré sú vhodnými substrátmi pre rast mikroorganizmov. Len veľmi málo z nich je však schopných laktózu štiepiť.

Pre štúdium vplyvu koncentrácie proteolytického hydrolyzátu srvátky na produkciu biopolymérov boli zvolené kultivačné médiá, ktoré obsahovali 50; 25; 10 % hydrolyzátu srvátky a 10 % hydrolyzátu srvátky s pridaním 30 g/l glukózy ako je uvedené v tabuľke 4.1. Pre kontrolu a porovnanie slúžilo štandardné živné médium, ktoré obsahovalo 30 g/l glukózy, kvôli jeho dobrej výťažnosti pri produkcii PHA, ako bolo zistené Kristýnou Valovou [31]. Podrobný postup kultivácie sa nachádza v podkapitole 3.3.1.

Tab. 4.1: Štúdium vplyvu koncentrácie hydrolyzátu srvátky na tvorbu biopolymérov

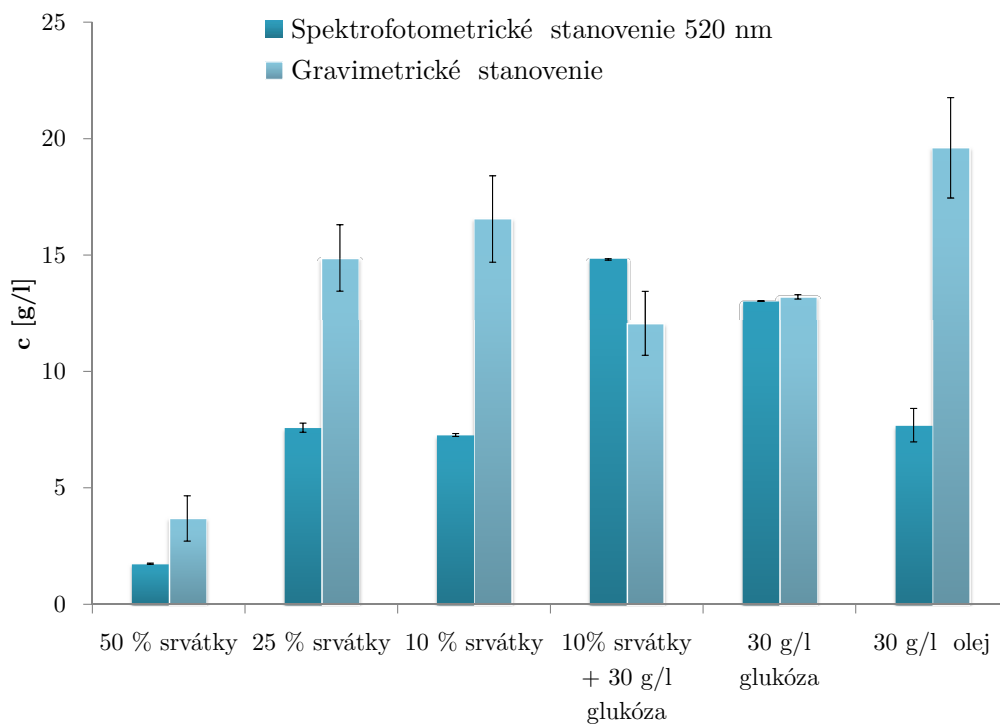
Hydrolyzát srvátky % obj.	Glukóza (g/l)
50	0
25	0
10	0
10	30
0	30

4.2.1 Stanovenie koncentrácie biomasy

Bola sledovaná koncentrácia biomasy v závislosti na množstve hydrolyzátu srvátky v kultivačnom médiu. Koncentrácia biomasy bola stanovená spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 520 nm (3.4.1) a gravimetricky centrifugáciou a následným sušením biomasy. (3.4.2). Ako možno vidieť na obrázku 4.5, spektrofotometrické stanovenie poskytovalo presnejšie výsledky s menšou smerodajnou odchýlkou. Jeden z parametrov ovplyvňujúcich presnosť gravimetrického stanovenia mohla byť prítomnosť soli, aj napriek prečisťovaniu.

V tabuľke 4.2 možno vidieť, že podľa spektrofotometrického stanovenia sa najvyššia koncentrácia biomasy 14,81 g/l nachádzala v médiu obsahujúcom 10 % hydrolyzátu srvátky a súčasne glukózu o koncentrácii 30 g/l. Hydrolyzát srvátky predstavoval na živiny bohatý substrát, zlepšujúci rastové vlastnosti kultúry. Gravimetrické stanovenie poukazuje na médium s 10 % hydrolyzátu srvátky, pri ktorom bola dosiahnutá koncentrácia biomasy až 16,55 g/l aj bez použitia glukózy. Médium s obsahom 50 % hydrolyzátu srvátky bolo na základe nízkej koncentrácie biomasy považované za nevhodné. Pri takej koncentrácii substrátu v živnom médiu pravdepodobne dochádzalo k inhibícii rastu.

Koncentrácia biomasy



Obr. 4.5: Koncentrácie biomasy, stanovená gravimetricky a spektrofotometricky pri $\lambda=520$ nm, v závislosti na percentuálnom podiele hydrolyzátu srvátky v živnom médiu

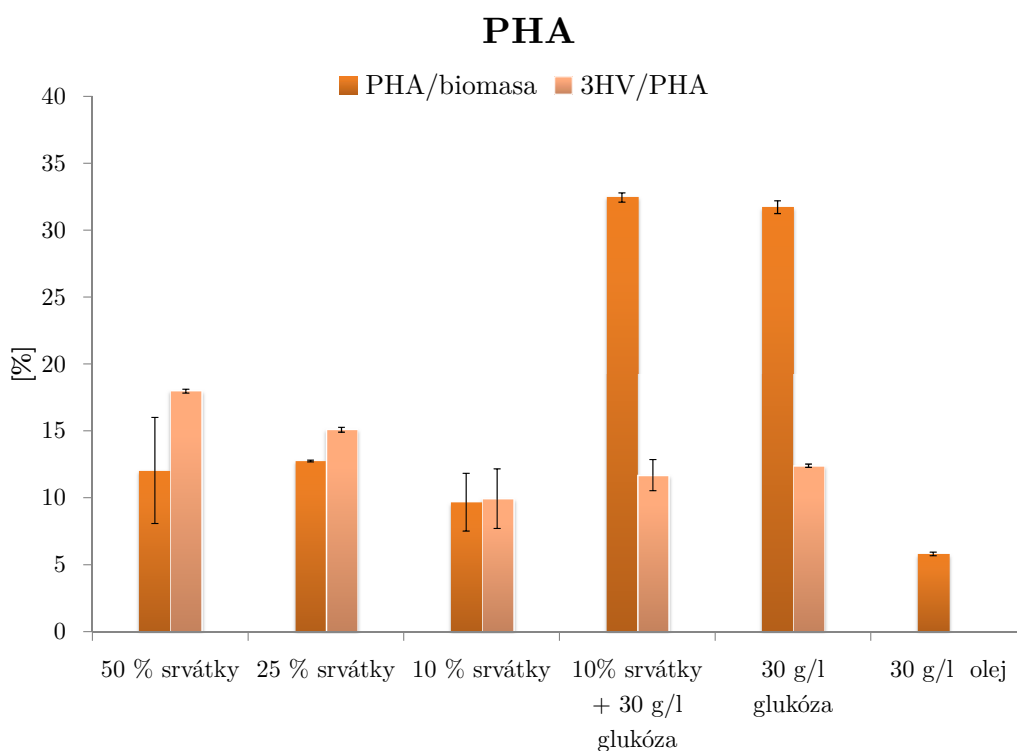
Tab. 4.2: Koncentrácia biomasy stanovená spektrofotometricky a gravimetricky pri použití hydrolyzátu srvátky

Zloženie substrátu	Spektrofotometricky 520 nm	Gravimetricky
	c [g/l]	c [g/l]
Hydrolyzát srvátky 50 %	$1,744 \pm 0,029$	$3,69 \pm 0,97$
Hydrolyzát srvátky 25 %	$7,587 \pm 0,196$	$14,88 \pm 1,43$
Hydrolyzát srvátky 10 %	$7,273 \pm 0,063$	$16,55 \pm 1,86$
Hydrolyzát srvátky 10 % + glukóza 30 g/l	$14,815 \pm 0,032$	$12,07 \pm 1,37$
Glukóza 30 g/l	$13,023 \pm 0,009$	$13,21 \pm 0,09$
Olej 20 g/l	$7,693 \pm 0,721$	$19,61 \pm 2,16$

4.2.2 Stanovenie koncentrácie PHA

Bola sledovaná produkcia PHA mikroorganizmom *Haloferax mediterranei* v závislosti na koncentrácii hydrolyzátu srvátky v médiu.

Z tabuľky 4.3, v ktorej sa nachádzajú výsledky merania možno vyčítať, že prídavok 10 % hydrolyzátu srvátky k médiu obsahujúcemu 30 g/l glukózy zvyšuje percentuálny obsah PHA v biomase. Bez pridania glukózy bolo možné pri 25 % hydrolyzátu srvátky dosiahnuť koncentráciu PHA 1,8875 g/l a výťažnosť 12,75 % PHA v biomase. Je možné tiež pozorovať, že vyprodukované PHA mali obsah 3HV o 2,69 % vyšší ako PHA vyprodukované pri médiu s obsahom 30 g/l glukózy.



Obr. 4.6: Percentuálny obsah PHA v biomase a 3HV v PHA v závislosti na percentuálnom podiele hydrolyzátu srvátky v živnom médiu

Tab. 4.3: Koncentrácia PHA stanovená pomocou GC-FID pri použití substrátu hydrolyzáta srvátky

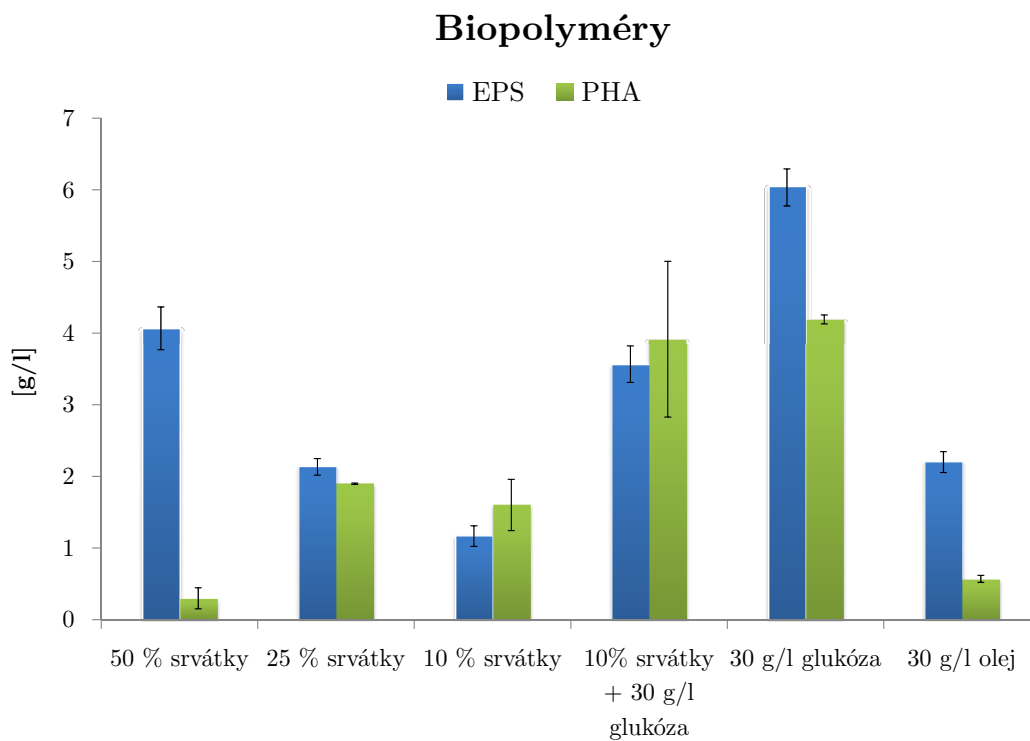
Zloženie substrátu	PHA [g/l]	PHA/biomasa [%]	3HV/PHA [%]
Hydrolyzát srvátky 50 %	0,30 ± 0,15	12,04 ± 3,96	17,98 ± 0,14
Hydrolyzát srvátky 25 %	1,89 ± 0,01	12,75 ± 0,07	15,09 ± 0,18
Hydrolyzát srvátky 10 %	1,60 ± 0,36	9,68 ± 2,16	9,94 ± 2,22
Hydrolyzát srvátky 10 % + glukóza 30 g/l	3,92 ± 1,96	32,45 ± 0,35	11,70 ± 1,17
Glukóza 30 g/l	4,19 ± 0,06	31,72 ± 0,47	12,40 ± 0,12
Olej 20 g/l	0,57 ± 0,05	5,81 ± 0,13	0,00 ± 0,00

4.2.3 Stanovenie koncentrácie EPS

Koncentrácia extracelulárnych polysacharidov bola stanovená gravimetricky. Gravimetrické stanovenie bolo prevedené zrážaním EPS zo supernatantu po centrifugácii biomasy a následným sušením do konštantnej hmotnosti. Podrobný postup sa nachádza v podkapitole 3.4.6. Cieľom opakovaného premývania a zrážania bolo prečistiť vzorky od soli, ktorej obsah má za následok skresľovanie výsledkov.

Podľa gravimetrického stanovenia bolo pre tvorbu EPS najvhodnejšie médium s obsahom 50 % hydrolyzáta srvátky bez použitia glukózy, ktoré bolo však vyhodnotené ako nevhodné pre rast kultúry. Výsledok gravimetrického stanovenia mohol byť skreslený z dôvodu zvyškového obsahu soli a zrážania látok aminokyselinového charakteru, ktoré sa v médiu nachádzali v podobe substrátu až v 50 % objemu.

Najvhodnejšou voľbou pre produkciu EPS bolo médium obsahujúce 10 % hydrolyzáta srvátky s 30 g/l glukózy, kedy koncentrácia EPS dosiahla hodnoty 3,57 g/ avšak nepresiahla hodnoty EPS pri kultivácii s využitím kontrolného média obsahujúceho 30 g/l glukózy. Na rozdiel od produkcie PHA teda hydrolyzát srvátky nemal výrazne pozitívny vplyv na tvorbu EPS.



Obr. 4.7: Koncentrácie biopolymérov (PHA a EPS) v závislosti na percentuálnom podiele hydrolyzátu srvátky v živnom médiu

Tab. 4.4: Koncentrácia EPS stanovená spektrofotometricky a gravimetricky pri použití substrátu hydrolyzátu srvátky

Zloženie substrátu	EPS [g/l]
Hydrolyzát srvátky 50 %	4,07 ± 0,30
Hydrolyzát srvátky 25 %	2,13 ± 0,12
Hydrolyzát srvátky 10 %	1,17 ± 0,14
Hydrolyzát srvátky 10 %+ glukóza 30 g/l	3,57 ± 0,25
Glukóza 30 g/l	6,03 ± 0,26
Olej 20 g/l	2,20 ± 0,15

4.3 Štúdium vplyvu koncentrácie hydrolyzátu peria na produkciu biopolymérov

Pri kultivácii *Haloferax mediterranei* bol ako substrát použitý hydrolyzát peria. Perie je odpadovým produktom hydinovej výroby a je len veľmi málo využívané pre ďalšie účely. Pre jeho malý dopyt je jeho využitie žiadúce a nízkonákladové.

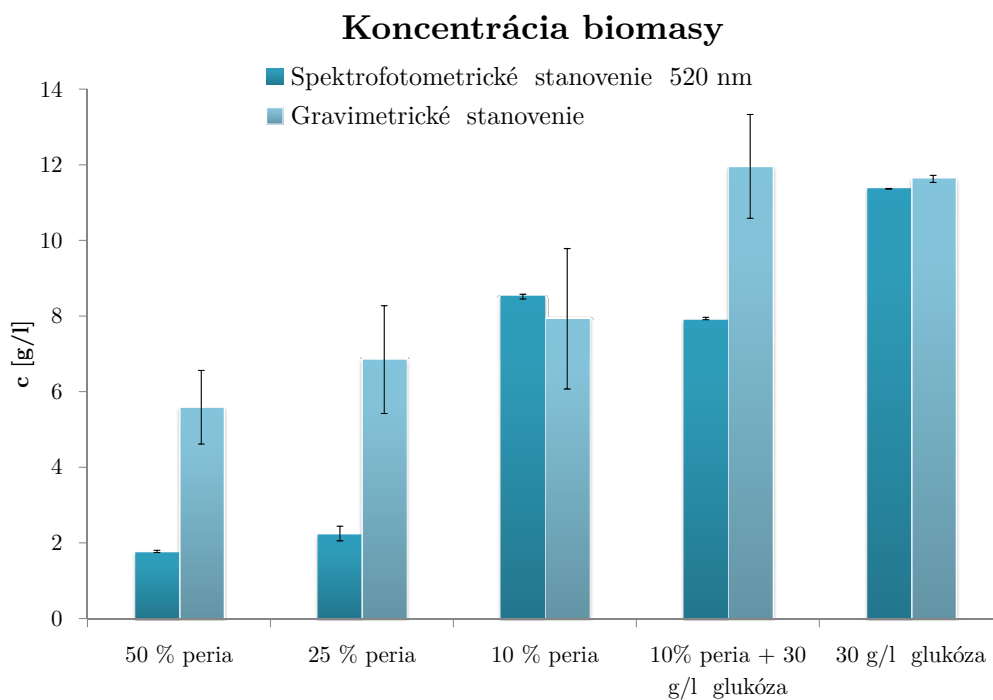
Tab. 4.5: Štúdium vplyvu koncentrácie hydrolyzátu peria na tvorbu biopolymérov

Hydrolyzát peria % obj.	Glukóza (g/l)
50	0
25	0
10	0
10	30
0	30

4.3.1 Stanovenie koncentrácie biomasy

Bola sledovaná koncentrácia biomasy v závislosti na množstve hydrolyzátu peria pridaného do kultivačného média. Koncentrácia biomasy bola stanovená spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 520 nm (3.4.1) a gravimetricky centrifugáciou a následným sušením biomasy. (3.4.2). V tabuľke 4.6 možno vidieť výsledky merania.

Ako možno vidieť na obrázku 4.8, najvhodnejším zložením média pre rast biomasy bolo podľa gravimetrického stanovenia 10 % hydrolyzátu peria s prídavkom 30 g/l glukózy, pri ktorom bola nameraná koncentrácia biomasy až 11,96 g/l. Ako vhodné sa ukázalo aj médium, ktoré obsahovalo 10 % hydrolyzátu peria bez pridania glukózy, naopak najnižšia koncentrácia biomasy bola zaznamenaná pri 50 % hydrolyzátu peria. Médium s obsahom 50 % hydrolyzátu peria bolo rovnako ako médium s obsahom 50 % hydrolyzátu srvátky (4.2.1) vyhodnotené za nevhodné pre rast kultúry *Haloferax mediterranei* na základe nízkej produkcie biomasy v dôsledku inhibície spôsobenej substrátom.



Obr. 4.8: Koncentrácie biomasy, stanovená gravimetricky a spektrofotometricky pri $\lambda=520$ nm, v závislosti na percentuálnom podiele hydrolyzátu peria v živnom médiu

Tab. 4.6: Koncentrácia biomasy stanovená spektrofotometricky a gravimetricky pri použití hydrolyzátu peria

Zloženie substrátu	Spektrofotometricky 520 nm	Gravimetricky
	c [g/l]	c [g/l]
Hydrolyzát peria 50 %	$1,777 \pm 0,100$	$5,59 \pm 1,81$
Hydrolyzát peria 25 %	$2,250 \pm 0,041$	$6,85 \pm 2,31$
Hydrolyzát peria 10 %	$8,515 \pm 0,259$	$7,93 \pm 0,31$
Hydrolyzát peria 10 % + glukóza 30 g/l	$7,935 \pm 0,601$	$11,96 \pm 2,01$
Glukóza 30 g/l	$11,368 \pm 0,045$	$11,63 \pm 0,12$

4.3.2 Stanovenie koncentrácie PHA a celulárnych proteínov

Bola sledovaná produkcia PHA mikroorganizmom *Haloferax mediterranei* v závislosti na koncentrácii hydrolyzátu peria v médiu.

V tabuľke 4.7, v ktorej sa nachádzajú výsledky merania možno vidieť, že prídanie 10 % hydrolyzátu peria pozitívne ovplyvňuje produkciu PHA. Pri použití média s 10 % hydrolyzátu peria a 30 g/l glukózy bola dosiahnutá koncentrácia PHA 3,36 g/l a obsah PHA v biomase až 28,06 %. Koncentrácia PHA bola teda o 24,64 % vyššia ako pri použití média s obsahom 30 g/l glukózy bez použitia hydrolyzátu peria.

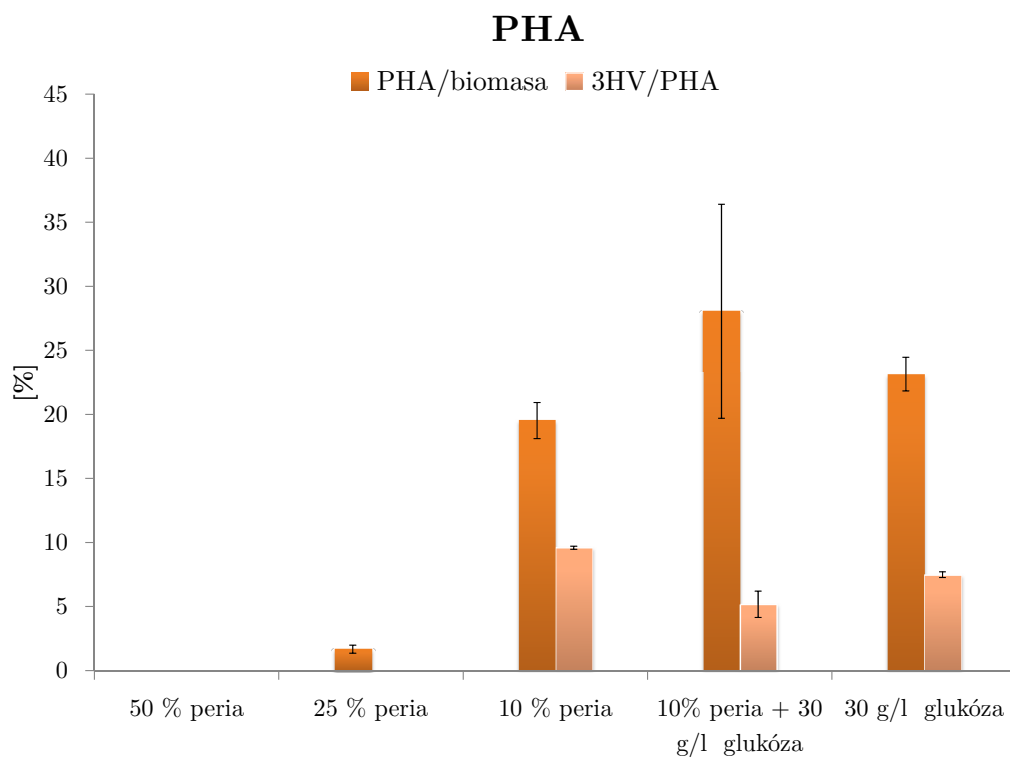
Koncentrácia celulárnych proteínov bola stanovená Hartree-Lowryho metódou z rozsuspenderovanej biomasy. Podrobný postup sa nadhádza v podkapitole 3.4.4. Najväčšia koncentrácia vyprodukovaných celulárnych proteínov bola zaznamenaná pri použití média s obsahom 10 % peria a 30 g/l glukózy. Ako možno vidieť v tabuľke 4.8, dosahovala hodnoty 1,8675 g/l. Obsah PHA v intracelulárnej matrix (PHA + celulárne proteíny) bol 62,89 %. Hodnoty koncentrácií celulárnych proteínov mohli byť ovplyvnené vyžrážaním proteínov z nespotrebovaného substrátu.

Úspešná bola kultivácia s použitím média s obsahom 10 % peria bez akéhokoľvek prídavku glukózy. Bola nameraná koncentrácia PHA 1,55 g/l a obsah PHA v biomase až 19,52 %. Vyprodukované PHA obsahovali o 1,9 % 3HV viac než pri použití samotnej glukózy. Koncentrácia celulárnych proteínov dosahovala hodnoty 1,18 g/l a podiel PHA v intracelulárnej matrix bol 56,66 %.

Najnižšie množstvo PHA bolo zaznamenané pri médiách s obsahom 50 a 25 % hydrolyzátu peria, kedy bol obsah PHA v príprade 50 % peria dokonca nemerateľný a pri 25 % nebol v dôsledku nízkeho obsahu PHA nameraný 3HV. Pri takomto objeme hydrolyzátu peria v médiu pravdepodobne dochádzalo k inhibícii rastu biomasy substrátom.

Tab. 4.7: Koncentrácia PHA stanovená pomocou GC-FID pri použití substrátu hydrolyzátu peria

Zloženie substrátu	PHA [g/l]	PHA/biomasa [%]	3HV/PHA [%]
Hydrolyzát peria 50 %	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Hydrolyzát peria 25 %	0,12 ± 0,02	1,68 ± 0,31	0,00 ± 0,00
Hydrolyzát peria 10 %	1,55 ± 0,14	19,52 ± 1,41	9,59 ± 0,12
Hydrolyzát peria 10 % + glukóza 30 g/l	3,36 ± 1,00	28,06 ± 8,36	5,18 ± 1,03
Glukóza 30 g/l	2,69 ± 0,15	23,15 ± 1,32	7,49 ± 0,22



Obr. 4.9: Percentuálny obsah PHA v biomase a 3HV v PHA v závislosti na percentuálnom podiele hydrolyzátu peria v živnom médiu

Tab. 4.8: Koncentrácia celulárnych proteínov stanovená Hartree-Lowryho metódou pri použití hydrolyzátu peria

Zloženie substrátu	Celulárne proteíny [g/l]	PHA/PHA + proteíny [%]
Hydrolyzát peria 50 %	1,09 ± 0,03	0,00 ± 0,00
Hydrolyzát peria 25 %	0,51 ± 0,02	18.52 ± 1,15
Hydrolyzát peria 10 %	1,18 ± 0,01	56.66 ± 1,35
Hydrolyzát peria 10 % + glukóza 30 g/l	1,87 ± 0,01	62.89 ± 10,04
Glukóza 30 g/l	1,55 ± 0,01	63.35 ± 1,87

4.3.3 Stanovenie koncentrácie EPS

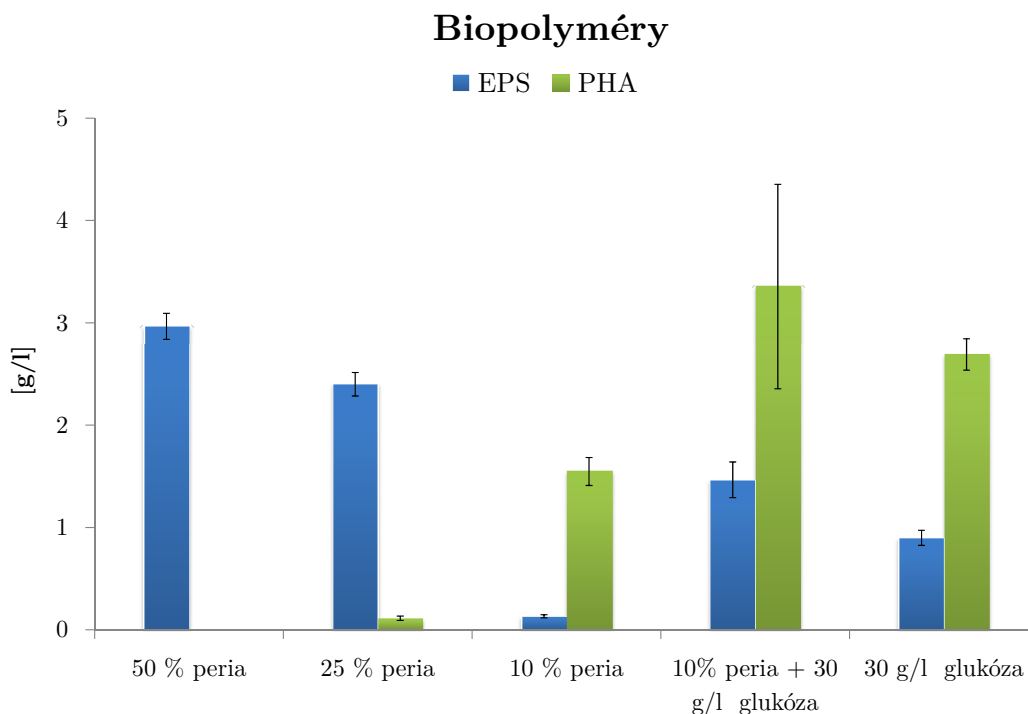
Koncentrácia extracelulárnych polysacharidov bola stanovená gravimetricky. Gravimetrické stanovenie bolo prevedené zrážaním EPS zo supernatantu po centrifugácii biomasy a následným sušením do konštantnej hmotnosti. Podrobný postup sa nachádza v podkapitole 3.4.6. Cieľom opakovaného premývania a zrážania bolo prečistiť vzorky od soli, ktorej obsah má za následok skresľovanie výsledkov.

Ako je možné vidieť v grafe 4.10, gravimetrické stanovenie ukázalo, že najvyššia koncentrácia EPS bola dosiahnutá pri médiu s obsahom 50 % hydrolyzátu peria, avšak rovnako ako pri hydrolyzáte srvátky bolo toto médium na základe nízkeho rastu biomasy a PHA vyhodnotené ako nevhodné. Výsledok gravimetrického stanovenia mohol byť pravdepodobne skreslený z dôvodu zvyškového obsahu soli a zrážaniu látok proteínového charakteru, ktoré sa v médiu nachádzali až v 50 % objemu. Pri médiu s obsahom 10 % hydrolyzátu peria a 30 g/l glukózy koncentrácia EPS dosiahla hodnoty 1,47 g/l a presiahla hodnoty EPS pri kultivácii s využitím kontrolného média obsahujúceho 30 g/l glukózy o 62,97 %. Pridanie hydrolyzátu peria v objeme 10% k štandardnému médiu obsahujúcemu 30 g/l glukózy malo pozitívny vplyv okrem rastu biomasy a produkcie PHA aj na tvorbu EPS.

Koncentrácia reziduálnych redukujúcich sacharidov v supernatante bola stanovovaná spektrofotometricky pomocou kyseliny 3,5-dinitrosalicylovej. Vzhľadom na hodnoty koncentrácií redukujúcich sacharidov v médiách s obsahom 10 % hydrolyzátu peria, 10 % hydrolyzátu peria s prídavkom 30 g/l glukózy a v kontrolnom médiu s koncentraciou glukózy 30 g/l, je v tabuľke 4.10 možné vidieť, že pri použití hydrolyzátu peria sa znižuje množstvo využitého substrátu sacharidovej povahy. Keďže samotný hydrolyzát peria neobsahuje žiadne sacharidy s redukčnými vlastnosťami, možno usúdiť, že s prídavkom 10 % hydrolyzátu peria k 30 g/l glukózy sa znížila spotreba glukózy o 19,66 %. Pre rast biomasy bol využitý zdroj aminokyselín pochádzajúci z hydrolyzátu peria za lepšej produkcie EPS a PHA.

Tab. 4.9: Koncentrácia EPS pri použití substrátu hydrolyzátu peria

Zloženie substrátu	EPS [g/l]
Hydrolyzát peria 50 %	2,97 ± 0,13
Hydrolyzát peria 25 %	2,40 ± 0,11
Hydrolyzát peria 10 %	0,13 ± 0,01
Hydrolyzát peria 10 %+ glukóza 30 g/l	1,47 ± 0,17
Glukóza 30 g/l	0,90 ± 0,07



Obr. 4.10: Koncentrácie biopolymérov (PHA a EPS) v závislosti na percentuálnom podiele hydrolyzátu peria v živnom médiu

Tab. 4.10: Koncentrácia reziduálnych sacharidov pri použití substrátu hydrolyzátu peria

Zloženie substrátu	Reziduálne sacharidy [g/l]
Hydrolyzát peria 50 %	0,000 ± 0,000
Hydrolyzát peria 25 %	0,000 ± 0,000
Hydrolyzát peria 10 %	0,000 ± 0,000
Hydrolyzát peria 10 %+ glukóza 30 g/l	15,458 ± 0,015
Glukóza 30 g/l	12,463 ± 0,332

4.4 Štúdium vplyvu objemu živného média na produkciu PHA a EPS

Na základe štúdia vplyvu koncentrácie hydrolyzátu peria na produkciu biopolymérov, ktoré sa nachádza v podkapitole 4.3, boli za najvhodnejšie z hľadiska zisku výťažku biomasy a PHA vyhodnotené médiá s obsahom 10 % hydrolyzátu peria a 10 % hydrolyzátu peria s pridaním 30 g/l

glukózy. Tieto médiá boli preto, za účelom optimalizácie produkcie, použité pre štúdium vplyvu objemu média v konštantnom objeme Erlenmeyerovej banky 250 ml na produkciu biopolymérov. Čím menej média sa nachádzalo v Erlenmeyerovej banke, tým bol väčší prístup kyslíka pre rast kultúry. Podrobný postup sa nachádza v podkapitole 3.3.3.

4.4.1 Stanovenie biomasy

Bola sledovaná koncentrácia biomasy, ktorá bola stanovená spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 520 nm (3.4.1) a gravimetricky centrifugáciou a následným sušením biomasy. (3.4.2).

Ako možno vidieť v grafe 4.11 najvyššia koncentrácia biomasy bola zaznamenaná pri 50 ml média v 250 ml Erlenmeyerovej banke s obsahom 10 % hydrolyzátu peria a 30 g/l glukózy, kedy mali bunky najväčší prístup kyslíka. Podľa spektrofotometrického stanovenia dosiahla hodnotu 7,679 g/l. Podobne vysoké hodnoty koncentrácie biomasy vykazovalo aj 100 ml média s rovnakým obsahom.

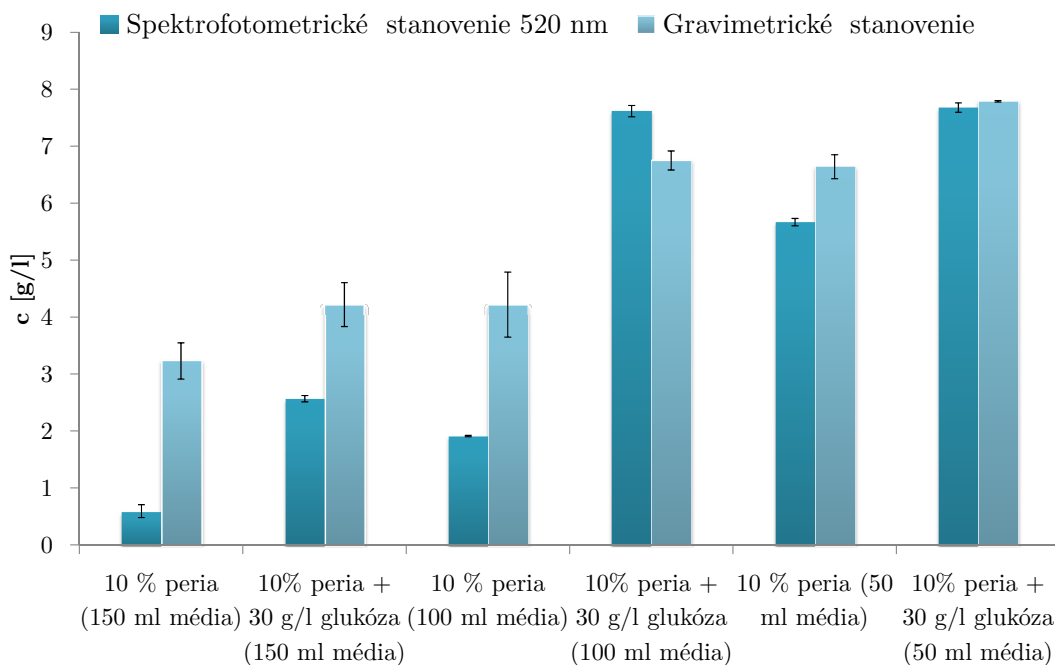
Bez použitia glukózy bolo najúspešnejšie médium o objeme 50 ml s koncentráciou biomasy 5,668 g/l. Najmenej vhodné bolo médium o objeme 150 ml bez použitia glukózy, kedy biomasa narástla len minimálne. Taký objem média v 250 ml Erlenmeyerovej banke pravdepodobne neposkytoval dostatočný prístup kyslíka. Vplyvom limitácie došlo k nízkej produkcii biomasy.

Na obrázku 4.11 je možné pozorovať rastúci trend koncentrácie biomasy s klesajúcim objemom média a s prídavkom glukózy o koncentrácii 30 g/l. Zvyšujúca sa koncentrácia biomasy bola sprevádzaná sýtejšou ružovou farbou živného média ako možno vidieť na obrázku 4.12.

Tab. 4.11: Koncentrácia biomasy stanovená spektrofotometricky a gravimetricky pri použití hydrolyzátu srvátky

Hydrolyzát peria [%]	Glukóza [g/l]	Médium [ml]	Spektrofotometricky 520 nm	Gravimetricky
			c [g/l]	c [g/l]
10	0	150	$0,594 \pm 0,113$	$3,23 \pm 0,31$
10	30	150	$2,568 \pm 0,055$	$4,22 \pm 0,39$
10	0	100	$1,911 \pm 0,013$	$4,22 \pm 0,57$
10	30	100	$7,617 \pm 0,099$	$6,75 \pm 0,17$
10	0	50	$5,668 \pm 0,065$	$6,64 \pm 0,21$
10	30	50	$7,679 \pm 0,082$	$7,79 \pm 0,01$

Koncentrácia biomasy



Obr. 4.11: Koncentrácia biomasy, stanovená gravimetricky a spektrofotometricky pri $\lambda=520$ nm, v závislosti na objeme produkčného média

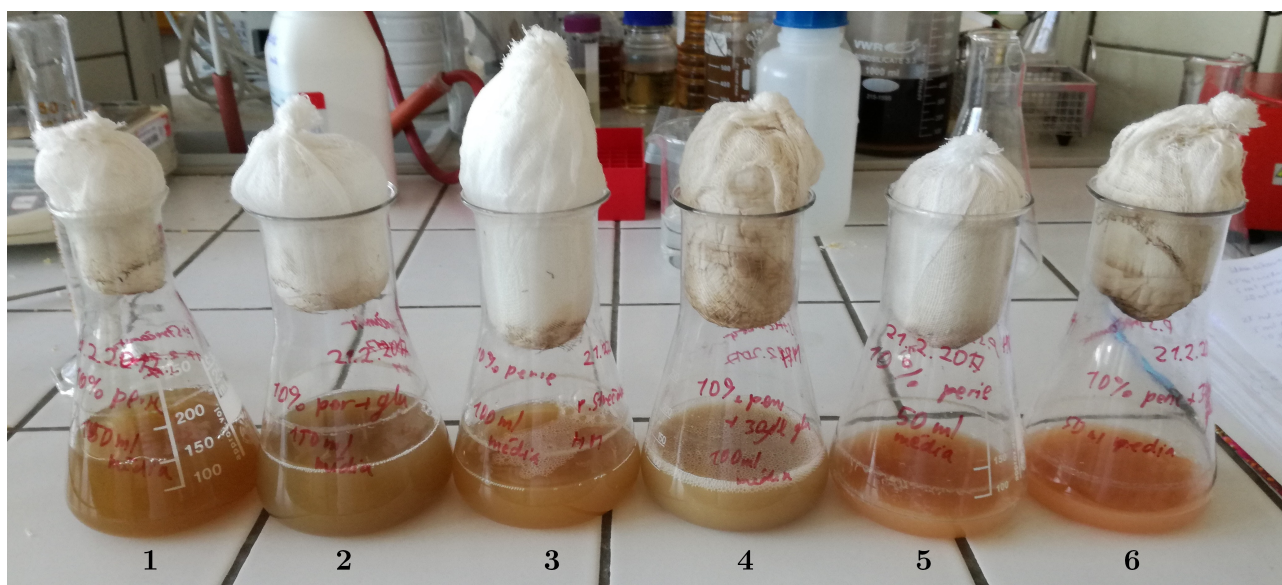
4.4.2 Stanovenie koncentrácie PHA a celulárnych proteínov

Bola sledovaná produkcia PHA mikroorganizmom *Haloferax mediterranei* v závislosti na objeme média.

Ako možno vidieť v tabuľke 4.12, najvyššia koncentrácia PHA bola dosiahnutá pri 50 ml média s obsahom 10 % hydrolyzátu peria a 30 g/l glukózy a dosahovala hodnoty 1,95 g/l. PHA sa nachádzalo v biomase v množstve 25,06 % a 3HV tvoril 10,09 % PHA.

Pri tomto médiu bola stanovená koncentrácia celulárnych proteínov Hartree-Lowryho metódou na 2,20 g/l a podiel PHA v intracelulárnej matrix (PHA+celulárne proteíny) 46,82 %. Porovnaním hodnôt PHA a celulárnych proteínov pri médiách obsahujúcich 10 % hydrolyzátu peria s 30 g/l glukózy v objeme 50 a 100 ml, je možné si všimnúť, že pri 100 ml média bola produkcia celulárnych proteínov značne vyššia a koncentrácia PHA nižšia ako pri 50 ml média. To naznačuje posunutie metabolizmu kultúry smerom tvorby proteínov na úkor produkcie PHA.

Pri objeme 50 ml bola dosiahnutá koncentrácia PHA 1,31 g/l a obsah PHA v biomase 19,78 % aj bez použitia glukózy. Obsah 3HV v PHA bol o 1,98 % vyšší ako pri použití média s obsahom 30 g/l glukózy. V tabuľke 4.13 možno vidieť, že celulárne proteíny sa v biomase nachádzali



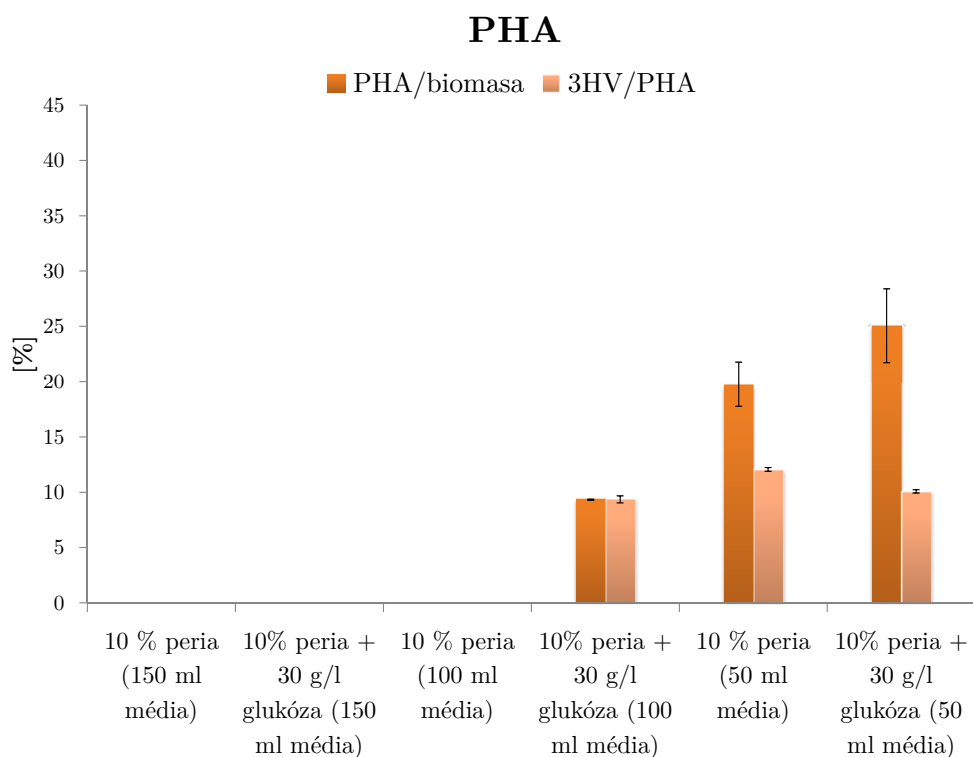
Obr. 4.12: Kultivácia *Haloferax mediterranei* s využitím rôzneho objemu média. Na obrázku možno vidieť: **1** – 10% hydrolyzátu peria (150 ml); **2** – 10% hydrolyzátu peria + 30 g/l glukóza (150 ml); **3** – 10% hydrolyzátu peria (100 ml); **4** – 10% hydrolyzátu peria + 30 g/l glukóza (100 ml); **5** – 10% hydrolyzátu peria (50 ml); **6** – 10% hydrolyzátu peria + 30 g/l glukóza (50 ml)

v koncentrácii 2,86 g/l a podiel PHA v intracelulárnej matrix bol 31,43 %. Hodnoty koncentrácií celulárnych proteínov mohli byť ovplyvnené vyzrážaním proteínov z nespotrebovaného substrátu.

Média s objemom 150 ml neposkytovali dostatočný objem vzduchu pre optimálny rast biomasy a následnú produkciu PHA. Pri použití 100 ml média bez prídavku glukózy boli hodnoty PHA nemerateľné.

Tab. 4.12: Koncentrácia PHA stanovená pomocou GC-FID pri použití rôzneho objemu média

Hydrolyzát peria [%]	Glukóza [g/l]	Médium [ml]	PHA [g/l]	PHA/biomasa[%]	3HV/PHA[%]
10	0	150	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
10	30	150	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
10	0	100	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
10	30	100	0,63 ± 0,01	9,33 ± 0,05	9,36 ± 0,32
10	0	50	1,31 ± 0,13	19,78 ± 1,99	12,07 ± 0,17
10	30	50	1,95 ± 0,26	25,06 ± 3,34	10,09 ± 0,15



Obr. 4.13: Percentuálny obsah PHA v biomase a 3HV v PHA v závislosti na objeme produkčného média

Tab. 4.13: Koncentrácia celulárnych proteínov stanovená Hartree-Lowryho metódou pri použití rôzneho objemu média

Hydrolyzáť peria [%]	Glukóza [g/l]	Médium [ml]	Celulárne proteíny [g/l]	PHA/PHA + proteíny [%]
10	0	150	1,54 ± 0,17	0,00 ± 0,00
10	30	150	1,51 ± 0,11	0,00 ± 0,00
10	0	100	1,60 ± 0,04	0,00 ± 0,00
10	30	100	3,29 ± 0,31	16,06 ± 0,10
10	0	50	2,86 ± 0,19	31,43 ± 3,07
10	30	50	2,20 ± 0,06	46,82 ± 4,71

4.4.3 Stanovenie koncentrácie EPS

Koncentrácia extracelulárnych polysacharidov bola stanovená gravimetricky. Gravimetrické stanovenie bolo prevedené zrážaním EPS zo supernatantu po centrifugácii biomasy a následným sušením do konštantnej hmotnosti. Podrobný postup sa nachádza v podkapitole 3.4.6. Cieľom opakovaného premývania a zrážania bolo prečistiť vzorky od soli, ktorej obsah má za následok skresľovanie výsledkov.

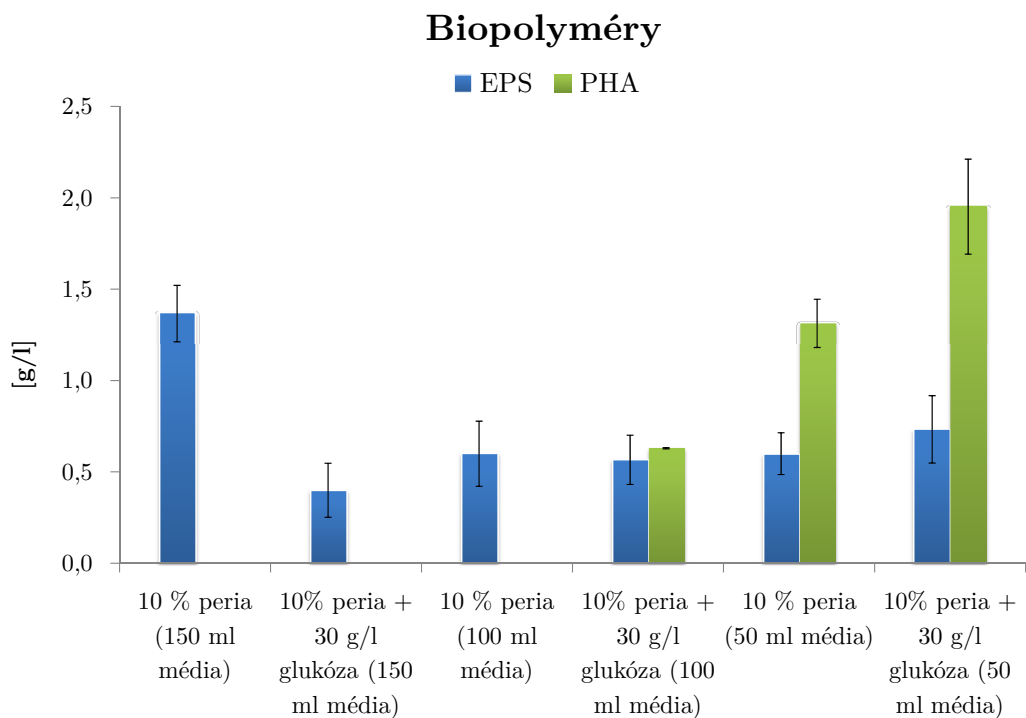
Gravimetrické stanovenie ukázalo, že najvyššia koncentrácia EPS bola dosiahnutá pri médiu s objemom 150 ml bez obsahu glukózy, pri tomto médiu však kultúra narástla len minimálne a koncentrácia PHA bola nemerateľná. Tento objem média bol z dôvodu nedostatočného prístupu kyslíka a následnej limitácie rastu biomasy vyhodnotený za nevhodný. Gravimetrické stanovenie EPS bolo pravdepodobne ovplyvnené vyzrážaním látok proteínového charakteru pochádzajúcich zo zvyškov substrátu.

Pri médiu s objemom 50 ml a obsahom 10 % hydrolyzátu peria a 30 g/l glukózy, ktoré bolo vyhodnotené za najlepšie, koncentrácia EPS dosiahla hodnoty 0,73 g/l a bez pridania glukózy 0,60 g/l. Na hodnotách reziduálnych redukujúcich sacharidov v médiách s počiatočným obsahom glukózy 30 g/l možno pozorovať rastúci trend v závislosti na znižujúcom sa objeme média s lepším výsledným rastom biomasy a vyššou produkciou PHA a EPS. Vzhľadom na tento trend, možno usúdiť, že hoci kultúra rástla lepšie, nemala za prítomnosti hydrolyzátu peria tendencie spotrebúvať viac substrátu sacharidovej povahy.

Vzhľadom na rast archebaktérie *Haloferax mediterranei* aj bez prítomnosti akejkoľvek glukózy, je možné konštatovať, že kultúra je schopná porovnateľného rastu a produkcie biopolymérov aj s využitím substrátu bohatého na aminokyseliny.

Tab. 4.14: Koncentrácia EPS pri použití rôzneho objemu média

Hydrolyzát peria [%]	Glukóza [g/l]	Médium [ml]	EPS [g/l]
10	0	150	1,37 ± 0,16
10	30	150	0,40 ± 0,15
10	0	100	0,60 ± 0,18
10	30	100	0,57 ± 0,13
10	0	50	0,60 ± 0,11
10	30	50	0,73 ± 0,18



Obr. 4.14: Koncentrácie biopolymérov (PHA a EPS) a nevyužitých redukujúcich sacharidov v závislosti na objeme živného média

Tab. 4.15: Koncentrácia reziduálnych sacharidov pri použití rôzneho objemu média

Hydrolyzáť peria [%]	Glukóza [g/l]	Médium [ml]	Reziduálne sacharidy [g/l]
10	0	150	0,000 ± 0,000
10	30	150	5,281 ± 0,665
10	0	100	0,000 ± 0,000
10	30	100	7,147 ± 0,807
10	0	50	0,000 ± 0,000
10	30	50	8,420 ± 0,639

5 ZÁVER

Bakalárska práca bola zameraná na biotechnologickú produkciu biopolymérov pomocou halo-filného mikroorganizmu *Haloferax mediterranei*, ktorý je vďaka špecifickým podmienkam pre svoj rast objektom záujmu posledných štúdií produkcie polyhydroxyalkanoátov (PHA). Súčasťou práce je teoretická rešerš, ktorá obsahuje úvod do problematiky znečistenia životného prostredia v dôsledku množenia nerozložiteľného odpadu a snahy o nahradenie petrochemických plastov pomocou bioplastov vyrobených z PHA. *Haloferax mediterranei* je schopný produkcie PHA, konkrétne kopolyméru poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát), bez nutnosti prídavku prekurzoru syntézy 3-hydroxyvalerátu.

Bc. Kristýna Valová vo svojej bakalárskej práci [31] v roku 2016 za najvhodnejší substrát pre rast kultúry a tvorbu PHA vyhodnotila glukózu v koncentrácii 30 g/l. V rámci experimentálnej časti tejto bakalárskej práce dané médium slúžilo pre kontrolu rastových vlastností kultúry a porovnanie výsledkov s výsledkami kultivácie s využitím odpadových substrátov.

Bol sledovaný vplyv rôznej koncentrácie odpadových substrátov ako je proteolytický hydrolyzát srvátky, hydrolyzát hydínového peria v médiu a vplyv objemu média a s ním súvisiaceho prístupu kyslíka na produkciu biopolymérov.

Prídavok proteolytického hydrolyzátu srvátky v objeme 10 % do média obsahujúceho 30 g/l glukózy mal pozitívny vplyv na rast biomasy, ktorá bola analyzovaná turbidimetricky. Úspešné bolo médium s obsahom 25 % hydrolyzátu srvátky bez akéhokoľvek prídavku glukózy, kedy bola nameraná koncentrácia PHA 1,89 g/l s vyšším obsahom 3HV ako pri použití média s obsahom glukózy 30 g/l. Na produkciu EPS nemal hydrolyzát peria výrazne pozitívny vplyv. Vyšší obsah hydrolyzátu srvátky v médiu ako 25 % spôsoboval inhibíciu rastu biomasy a následne nízku akumuláciu PHA.

Pri použití média s obsahom 10 % hydrolyzátu peria kultúra preukazovala dobré rastové vlastnosti a produkciu PHA aj bez prídavku glukózy. Rovnako ako pri kultivácii s využitím hydrolyzátu srvátky bez prídavku glukózy, aj v tomto prípade bol obsah 3HV v PHA o 2-3 % vyšší ako pri médiách s obsahom glukózy 30 g/l. Prídavok hydrolyzátu peria 10 % k médiu obsahujúcemu 30 g/l glukózy výrazne zvýšil koncentráciu PHA, obsah PHA v biomase a tiež koncentráciu EPS. Na základe pozorovania koncentrácie reziduálnych redukujúcich sacharidov, je možné konštatovať, že prídavok hydrolyzátu peria mal vplyv na zníženie spotreby substrátu sacharidovej povahy. Vyšší obsah hydrolyzátu peria ako 10% spôsoboval inhibíciu rastu biomasy a nízku akumuláciu PHA.

Na základe vyhodnotenia médií s obsahom 10 % hydrolyzátu peria za najvhodnejšie z hľadiska rastu biomasy a akumulácie PHA bol s ich využitím pozorovaný vplyv objemu média a s ním súvisiaceho prístupu kyslíka na produkciu biopolymérov. Najvyššia produkcia biomasy a PHA bola zaznamenaná pri 50 ml média s obsahom 10 % hydrolyzátu peria a 30 g/l glukózy v 250 ml Erlenmeyerovej banke. Úspešná bola aj kultivácia s 50 ml média obsahujúceho 10 % hydrolyzátu peria bez použitia glukózy, kedy mali vyprodukované PHA vyšší obsah 3HV ako s jej použitím. Pri použití 100 ml média s obsahom glukózy a 10 % hydrolyzátu peria bola nameraná vyššia koncentrácia celulárnych proteínov a výrazne nižšia koncentrácia PHA ako pri použití 50 ml média s rovnakým obsahom. Média v objeme 150 ml poskytovali nemerateľnú koncentráciu PHA.

Tento objem média pravdepodobne neposkytoval dostatočný prístup kyslíka pre rast biomasy a následnú akumuláciu PHA. Na produkciu EPS nemal objem média výrazný vplyv.

Vzhľadom na rast archeobaktérie *Haloferax mediterranei* aj bez prítomnosti akejkoľvek glukózy, je možné usúdiť, že kultúra je schopná porovnateľného rastu a produkcie biopolymérov aj s využitím substrátu bohatého na aminokyseliny.

Porovnávaním výsledkov pri kultivácii média s obsahom 10 % hydrolizátu peria alebo hydrolyzátu srvátky a 30 g/l glukózy s kontrolným médiom, ktoré žiaden odpadový substrát neobsahovalo, bol preukázaný pozitívny vplyv daných zdrojov aminokyselín pre rast kultúry, produkciu PHA a vyšší obsah 3HV v produkovanom kopolyméri.

Je známe, že začlenením 3-hydroxyvalerátu do PHB vzniká PHBV, ktorý je poddajnejší a umožňuje širšie možnosti aplikácie než poly(3-hydroxybutyrát). Pokračovaním tejto práce by mohlo byť štúdium vplyvu koncentrácie substrátov proteínového charakteru bez použitia glukózy na obsah 3HV v kopolyméry P(3HB-co-3HV) pomocou *Haloferax mediterranei*.

Vyprodukované polyhydroxyalkanoáty majú budúcnosť ako alternatíva syntetických plastov. Využitie substrátov, ako je napríklad hydrolyzát srvátky a peria predstavuje nielen ekologický krok v rámci využitia odpadových produktov mliekárenskej a hydinovej výroby, ale aj možnosť zníženia produkčnej ceny PHA. Ďalším možným znížením ceny je práve využitie extrémne halofilného archeónu *Haloferax mediterranei*, ktorý produkoval biomasu v médiu s obsahom soli 150 g/l. Vysoká salinita eliminuje možnosť kontaminácie, a tým aj náklady na potrebnú sterilizáciu procesu kultivácie, čo by mohlo umožniť zvýšenie komerčnej výroby a využitia bioplastov z polyhydroxyalkanoátov v bežnom živote.

LITERATÚRA

- [1] Imre, B., Pukánszky, B. *Compatibilization in bio-based and biodegradable polymer blends* . *European Polymer Journal*. 2013, ročník 49, 6, str. 1215 – 1233 ISSN 0014-3057 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.01.019>.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305713000372>
- [2] REHM, B. *Microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives* . Wymondham: Caister Academic, 2009. ISBN 19-044-5536-0.
- [3] Gandini, A., Belgacem, M. N.: *4 - The State of the Art of Polymers from Renewable-Resources* . In: *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*, editace Ebnesajjad, S. Plastics Design Library str. 71 – 85 Boston: William Andrew Publishing 2013 ISBN 978-1-4557-2834-3 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4557-2834-3.00004-5>.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455728343000045>
- [4] Kim, S., Xu, J., Liu, S. *Production of biopolymer composites by particle bonding* . *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. 2010, ročník 41, 1, str. 146 – 153 ISSN 1359-835X doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.compositesa.2009.09.019> special Issue: Flow Processes in Composite Materials.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359835X09002942>
- [5] Osman, Y., Elrazak, A. A., Khater, W. Microbial biopolymer production by Microbacterium {WA81} in batch fermentation. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2016, ročník 3, 3, str. 250 – 262 ISSN 2314-808X doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbas.2016.05.001>.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2314808X16300148>
- [6] Keshavarz, T., Roy, I. *Polyhydroxyalkanoates* . *Current Opinion in Microbiology*. 2010, ročník vol. 13, issue 3, str. 321–326 ISSN 13695274 doi:[10.1016/j.mib.2010.02.006](http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2010.02.006).
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527410000275>
- [7] Możejko-Ciesielska, J., Kiewisz, R. *Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?* . *Microbiological Research*. 2016, ročník 192, str. 271 – 282 ISSN 0944-5013 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2016.07.010>.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094450131630043X>
- [8] Reddy, C., Ghai, R., Rashmi, Kalia, V. *Polyhydroxyalkanoates: an overview* . *Bioresource Technology*. 2003, ročník 87, 2, str. 137 – 146 ISSN 0960-8524 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00212-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00212-2).
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852402002122>
- [9] Leong, Y. K., Show, P. L., Ooi, C. W., Ling, T. C., Lan, J. C.-W. *Current trends in polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis: Insights from the recombinant Escherichia coli* . *Journal of Biotechnology*. 2014, ročník 180, str. 52 – 65 ISSN 0168-1656 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.03.020>.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165614001321>
- [10] Verlinden, R., Hill, D., Kenward, M., Williams, C., Radecka, I. *Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates* . *Journal of Applied Microbiology*. 2007, ročník 102, 6, str. 1437–1449 ISSN 1365-2672 doi:[10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x).
URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x>

- [11] Hermann-Krauss, C., Koller, M., Muhr, A., Fasl, H., Stelzer, F., Braunegg, G. *Archaeal Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Co- and Terpolyesters from Biodiesel Industry-Derived By-Products* . *Archaea*. 2013, ročník vol. 2013, str. 1–10 ISSN 1472-3646 doi:10.1155/2013/129268.
URL <http://www.hindawi.com/journals/archaea/2013/129268/>
- [12] Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., Alvarez, V. *Polyhydroxyalkanoate (PHA)* . , doi: 10.3144/expresspolymlett.2014.82.
URL <http://www.expresspolymlett.com/letolt.php?file=EPL-0005219>
- [13] Volova, T., Boyandin, A., Vasiliev, A., Karpov, V., Prudnikova, S., Mishukova, O., Boyarskikh, U., Filipenko, M., Rudnev, V., Xuân, B. B., Dũng, V. V., Gitelson, I. *Biodegradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in tropical coastal waters and identification of PHA-degrading bacteria* . *Polymer Degradation and Stability*. 2010, ročník 95, 12, str. 2350 – 2359 ISSN 0141-3910 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.08.023>.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391010003642>
- [14] Volova, T. G. *Biodegradation of Polyhydroxyalkanoates in Natural Soils* . *Journal of Siberian Federal University. Biology*. 2015, ročník 8, 2, str. 152–167 doi:10.17516/1997-1389-2015-8-2-152-167.
URL http://elib.sfu-kras.ru/bitstream/2311/19747/1/03_Volova.pdf
- [15] Myung, J., Strong, N. I., Galega, W. M., Sundstrom, E. R., Flanagan, J. C., Woo, S.-G., Waymouth, R. M., Criddle, C. S. *Disassembly and reassembly of polyhydroxyalkanoates: Recycling through abiotic depolymerization and biotic repolymerization* . *Bioresource Technology*. 2014, ročník 170, str. 167 – 174 ISSN 0960-8524 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.105>.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414010943>
- [16] Dietrich, K., Dumont, M.-J., Rio, L. F. D., Orsat, V. *Producing PHAs in the bioeconomy — Towards a sustainable bioplastic* . *Sustainable Production and Consumption*. 2017, ročník vol. 9, str. 58–70 ISSN 23525509 doi:10.1016/j.spc.2016.09.001.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352550916300203>
- [17] KOLLER, A. O. R. M. a. P. K., Martin *Recycling of Waste Streams of the Biotechnological Poly(hydroxyalkanoate) Production by Haloferax mediterranei on Whey* . *International Journal of Polymer Science*. 2015, ročník 2015, str. 1–8 ISSN 1687-9422 doi:10.1155/2015/370164.
URL <http://www.hindawi.com/journals/ijps/2015/370164/>
- [18] Madigan, M. T., Orent, A. *Thermophilic and halophilic extremophiles* . *Current Opinion in Microbiology*. 1999, ročník 2, 3, str. 265 – 269 ISSN 1369-5274 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80046-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80046-0).
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527499800460>
- [19] Cyplik, P., Grajek, W., Marecik, R., Kroliczak, P. *Effect of macro/micro nutrients and carbon source over the denitrification rate of Haloferax denitrificans archaeon* . *Enzyme and Microbial Technology*. 2007, ročník 40, 2, str. 212 – 220 ISSN 0141-0229 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.04.003>.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022906002018>

- [20] Marhuenda-Egea, F. C., Bonete, M. J. *Extreme halophilic enzymes in organic solvents . Current Opinion in Biotechnology*. 2002, ročník 13, 4, str. 385 – 389 ISSN 0958-1669 doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00338-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00338-5).
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166902003385>
- [21] DasSarma, S., DasSarma, P. *Halophiles and their enzymes . Current Opinion in Microbiology*. 2015, ročník vol. 25, str. 120–126 ISSN 13695274 doi:10.1016/j.mib.2015.05.009.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527415000600>
- [22] Yin, J., Chen, J.-C., Wu, Q., Chen, G.-Q. *Halophiles, coming stars for industrial biotechnology . Biotechnology Advances*. 2015, ročník vol. 33, issue 7, str. 1433–1442 ISSN 07349750 doi:10.1016/j.biotechadv.2014.10.008.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975014001578>
- [23] Pais, J., Serafim, L. S., Freitas, F., Reis, M. A. *Conversion of cheese whey into poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by Haloferax mediterranei . New Biotechnology*. 2016, ročník 33, 1, str. 224 – 230 ISSN 1871-6784 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2015.06.001>.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871678415001181>
- [24] Hou, J., Xiang, H., Han, J. *Propionyl Coenzyme A (Propionyl-CoA) Carboxylase in Haloferax mediterranei: Indispensability for Propionyl-CoA Assimilation and Impacts on Global Metabolism . Applied and Environmental Microbiology*. 2014, ročník 81, 2, str. 794–804 ISSN 0099-2240 doi:10.1128/aem.03167-14.
URL <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.03167-14>
- [25] Nwodo, U., Green, E., Okoh, A. *Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects . International Journal of Molecular Sciences*. 2012, ročník 13, 12, str. 14002–14015 doi: 10.3390/ijms131114002.
- [26] Hussain, A., Zia, K. M., Tabasum, S., Noreen, A., Ali, M., Iqbal, R., Zuber, M. *Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review . International Journal of Biological Macromolecules*. 2017, ročník 94, Part A, str. 10 – 27 ISSN 0141-8130 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.104>.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181301631234X>
- [27] Parolis, H., Parolis, L. A., Boán, I. F., Rodríguez-Valera, F., Widmalm, G., Manca, M., Jansson, P.-E., Sutherland, I. W. *The structure of the exopolysaccharide produced by the halophilic Archaeon Haloferax mediterranei strain R4 (ATCC 33500). Carbohydrate Research*. 1996, ročník 295, str. 147 – 156 ISSN 0008-6215 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215\(96\)90134-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215(96)90134-2).
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621596901342>
- [28] Huang, T.-Y., Duan, K.-J., Huang, S.-Y., Chen, C. W. *Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by Haloferax mediterranei . Journal of Industrial Microbiology*. 2006, ročník vol. 33, issue 8, str. 701–706 ISSN 1367-5435 doi: 10.1007/s10295-006-0098-z.
URL <http://link.springer.com/10.1007/s10295-006-0098-z>
- [29] Miller, G. L. *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar . Analytical Chemistry*. 1959, ročník vol. 31, issue 3, str. 426–428 ISSN 0003-2700 doi:10.1021/ac60147a030.
URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60147a030>

- [30] Hartree, E. *Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response* . *Analytical Biochemistry*. 1972, ročník 48, 2, str. 422 – 427
ISSN 0003-2697 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90094-2](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(72)90094-2).
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269772900942>
- [31] VALOVÁ, K. *Produkce polyhydroxyalkanoátů pomocí *Haloferax mediterranei**. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 53 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

Skratka	Popis
λ	Vlnová dĺžka
PHA	Polyhydroxyalkanoáty
scl	krátkoreťazcové (short chain lenght)
mcl	so strednou dĺžkou reťazca (medium chain lenght)
3HB	3-hydroxybutyrát
3HV	3-hydroxyvalerát
P(3HB- <i>co</i> -3HV)	Poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -3-hydroxyvalerát)
GC	Plynová chromatografia (Gas chromatography)
FID	Detekcia plameňovou ionizáciou (Flame ionization detection)
EPS	Extracelulárne polysacharidy
OD	Optická hustota (optical density)
ISTD	Interný štandard
DNS	Kyselina 3,5-dinitrosalicylová
CoA	Koenzým A

ZOZNAM OBRÁZKOV

2.1	Chemická štruktúra polyhydroxyalkanoátov [7]	9
2.2	Biosyntetická dráha poly(3-hydroxybutyrátu) [8]	11
2.3	<i>Haloferax mediterranei</i> v exponenciálnej, stacionárnej fázi [24].	16
2.4	Štruktúra EPS produkovaných mikroorganizmom <i>Haloferax mediterranei</i> [27].	19
4.1	Kalibračná krivka závislosti absorbancie na koncentrácii redukujúcich sacharidov	28
4.2	Kalibračná krivka závislosti absorbancie na koncentrácii celulárnych proteínov	29
4.3	Kalibračná krivka závislosti pomeru plôch pík 3HB a interného štandardu (ISTD) na hmotnosti 3HB	30
4.4	Kalibračná krivka závislosti pomeru plôch pík 3HV a interného štandardu (ISTD) na hmotnosti 3HV	30
4.5	Koncentrácie biomasy, stanovená gravimetricky a spektrofotometricky pri $\lambda=520$ nm, v závislosti na percentuálnom podiele hydrolyzátu srvátky v živnom médiu	32
4.6	Percentuálny obsah PHA v biomase a 3HV v PHA v závislosti na percentuálnom podiele hydrolyzátu srvátky v živnom médiu	33
4.7	Koncentrácie biopolymérov (PHA a EPS) v závislosti na percentuálnom podiele hydrolyzátu srvátky v živnom médiu	35
4.8	Koncentrácie biomasy, stanovená gravimetricky a spektrofotometricky pri $\lambda=520$ nm, v závislosti na percentuálnom podiele hydrolyzátu peria v živnom médiu	37
4.9	Percentuálny obsah PHA v biomase a 3HV v PHA v závislosti na percentuálnom podiele hydrolyzátu peria v živnom médiu	39
4.10	Koncentrácie biopolymérov (PHA a EPS) v závislosti na percentuálnom podiele hydrolyzátu peria v živnom médiu	41
4.11	Koncentrácia biomasy, stanovená gravimetricky a spektrofotometricky pri $\lambda=520$ nm, v závislosti na objeme produkčného média	43
4.12	Kultivácia <i>Haloferax mediterranei</i> s využitím rôzneho objemu média. Na obrázku možno vidieť: 1 – 10% hydrolyzátu peria (150 ml); 2 – 10% hydrolyzátu peria + 30 g/l glukóza (150 ml); 3 – 10% hydrolyzátu peria (100 ml); 4 – 10% hydrolyzátu peria + 30 g/l glukóza (100 ml); 5 – 10% hydrolyzátu peria (50 ml); 6 – 10% hydrolyzátu peria + 30 g/l glukóza (50 ml)	44
4.13	Percentuálny obsah PHA v biomase a 3HV v PHA v závislosti na objeme produkčného média	45

4.14	<i>Koncentrácie biopolymérov (PHA a EPS) a nevyužitých redukujúcich sacharidov v závislosti na objeme živného média</i>	47
------	---	----

ZOZNAM TABULIEK

2.1	Zhrnutie vlastností PHA [12]	10
3.1	Použité chemikálie	20
3.2	Použité prístroje	21
3.3	Zloženie živného média	22
3.4	Zloženie roztoku stopových prvkov SL6	22
4.1	Štúdium vplyvu koncentrácie hydrolyzátu srvátky na tvorbu biopolymérov	31
4.2	Koncentrácia biomasy stanovená spektrofotometricky a gravimetricky pri použití hydrolyzátu srvátky	32
4.3	Koncentrácia PHA stanovená pomocou GC-FID pri použití substrátu hydrolyzátu srvátky	34
4.4	Koncentrácia EPS stanovená spektrofotometricky a gravimetricky pri použití substrátu hydrolyzátu srvátky	35
4.5	Štúdium vplyvu koncentrácie hydrolyzátu peria na tvorbu biopolymérov	36
4.6	Koncentrácia biomasy stanovená spektrofotometricky a gravimetricky pri použití hydrolyzátu peria	37
4.7	Koncentrácia PHA stanovená pomocou GC-FID pri použití substrátu hydrolyzátu peria	38
4.8	Koncentrácia celulárnych proteínov stanovená Hartree-Lowryho metódou pri použití hydrolyzátu peria	39
4.9	Koncentrácia EPS pri použití substrátu hydrolyzátu peria	40
4.10	Koncentrácia reziduálnych sacharidov pri použití substrátu hydrolyzátu peria	41
4.11	Koncentrácia biomasy stanovená spektrofotometricky a gravimetricky pri použití hydrolyzátu srvátky	42
4.12	Koncentrácia PHA stanovená pomocou GC-FID pri použití rôzneho objemu média	44
4.13	Koncentrácia celulárnych proteínov stanovená Hartree-Lowryho metódou pri použití rôzneho objemu média	45
4.14	Koncentrácia EPS pri použití rôzneho objemu média	46
4.15	Koncentrácia reziduálnych sacharidov pri použití rôzneho objemu média	47
5.1	Charakteristika srvátky	60

5.2	<i>Koncentrácia jednotlivých aminokyselín v srvátke</i>	60
5.3	<i>Charakteristika hydrolyzátu peria</i>	61
5.4	<i>Koncentrácia jednotlivých aminokyselín v hydrolyzáte peria (60 g/l)</i>	61

ZOZNAM PRÍLOH

A Charakteristika hydrolyzátu srvátky	60
B Charakteristika hydrolyzátu peria	61

A CHARAKTERISTIKA HYDROLYZÁTU SRVÁTKY

Tab. 5.1: Charakteristika srvátky

Parameter	Koncentrácia [g/l]
Sušina	59,10 \pm 0,50
Popol	12,20 \pm 0,20
Laktóza	38,20 \pm 0,50
Glukóza	0,94 \pm 0,10
PO ₄ ³⁻	0,06 \pm 0,01
Celkový dusík	9,50 \pm 0,10

Tab. 5.2: Koncentrácia jednotlivých aminokyselín v srvátke

Aminokyselina	Koncentrácia [g/l]
Asparágová kyselina	59,10 \pm 0,50
Threonín	12,20 \pm 0,20
Serín	38,20 \pm 0,50
Glutámová kyselina	0,94 \pm 0,10
Prolín	0,54 \pm 0,04
Glycín	0,33 \pm 0,02
Alanín	0,51 \pm 0,08
Valín	0,48 \pm 0,07
Methionín	0,11 \pm 0,01
Isoleucín	0,69 \pm 0,07
Leucín	0,86 \pm 0,10
Tyrozín	0,21 \pm 0,03
Fenylalanín	0,24 \pm 0,02
Histidín	0,27 \pm 0,05
Lyzín	0,78 \pm 0,05
Arginín	0,28 \pm 0,04

B CHARAKTERISTIKA HYDROLYZÁTU PERIA

Tab. 5.3: Charakteristika hydrolyzátu peria

Parameter	Koncentrácia [g/l]
Sušina	$76,9 \pm 0,5$
Popol	$27,5 \pm 0,2$
Proteíny, peptidy	$33,1 \pm 0,5$
Celkový dusík	$45,7 \pm 0,3$

Tab. 5.4: Koncentrácia jednotlivých aminokyselín v hydrolyzáte peria (60 g/l)

Aminokyselina	Koncentrácia [g/l]
Asparágová kyselina	$2,8 \pm 0,3$
Threonín	$0,7 \pm 0,1$
Serín	$3,1 \pm 0,3$
Glutámová kyselina	$4,6 \pm 0,1$
Prolín	$4,4 \pm 0,4$
Glycín	$4,1 \pm 0,3$
Alanín	$2,1 \pm 0,3$
Valín	$3,8 \pm 0,2$
Methionín	$0,4 \pm 0,1$
Isoleucín	$2,0 \pm 0,4$
Leucín	$3,7 \pm 0,2$
Tyrozín	$2,3 \pm 0,2$
Fenylalanín	$1,8 \pm 0,1$
Histidín	$1,2 \pm 0,1$
Lyzín	$1,2 \pm 0,1$
Arginín	$1,2 \pm 0,1$